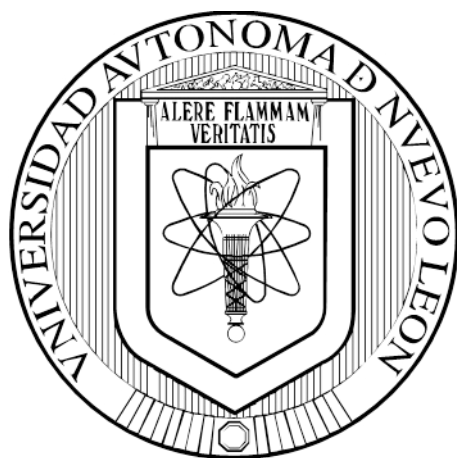


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA**



**ANÁLISIS DEL TRANSCRIPTOMA DE GLIOBLASTOMA (C6) TRAS LA
INHIBICIÓN POR ARNI DEL CO-FACTOR DE REMODELACIÓN DE LA
CROMATINA *ZMIZ1***

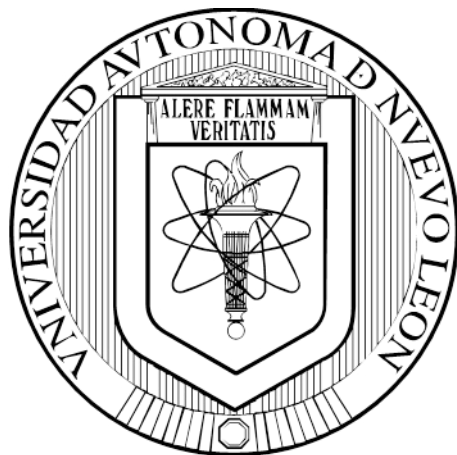
PRESENTA

L.B.G. ELDA ARIADNA FLORES CONTRERAS

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN
CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOLOGÍA MOLECULAR E INGENIERÍA
GENÉTICA**

NOVIEMBRE, 2016

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA**



**ANÁLISIS DEL TRANSCRIPTOMA DE GLIOBLASTOMA (C6) TRAS LA
INHIBICIÓN POR ARNI DEL CO-FACTOR DE REMODELACIÓN DE LA
CROMATINA *ZMIZ1***

PRESENTA

L.B.G. ELDA ARIADNA FLORES CONTRERAS

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN
CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOLOGÍA MOLECULAR E INGENIERÍA
GENÉTICA**

ASESOR: DR. EN C. CARLOS CÓRDOVA FLETES

NOVIEMBRE 2016

**"ANÁLISIS DEL TRANSCRIPTOMA DE GLIOBLASTOMA (C6) TRAS LA
INHIBICIÓN POR ARNI DEL CO-FACTOR DE REMODELACIÓN DE LA
CROMATINA ZMIZ1"**

Aprobación de la tesis:



Dr. en C. Carlos Córdova Fletes

Director de Tesis



Dra. en C. Ilse Delint Ramírez

Co-Directora de Tesis



Dra. en C. Herminia Guadalupe Martínez Rodríguez

Miembro de la Comisión de Tesis



Dra. med. Raquel Garza Guajardo

Subdirector de Estudios de Posgrado

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Citogenómica y Microarreglos perteneciente al Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. Carlos Córdova Fletes.

**Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León,
Monterrey, Nuevo León, 2016.**

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Carlos por permitirme estar en su laboratorio y tenerme mucha paciencia durante la realización de esta tesis y por siempre aconsejarme para hacer las cosas mejor.

A mi comisión de tesis por su apoyo, por siempre aclararme las dudas que tenía y por sus consejos.

A mis amigos y compañeros de laboratorio por todas las experiencias vividas y todo el apoyo que me brindaron a Montse, Ana, Valeria Antonio, Priscy, Carlos Piña, gracias chicos.

A Alex porque fue mi segundo maestro con todos sus consejos y la ayuda que me brindo en cada experimento.

A Paúl por ser como mi hermano y gracias Paúl por todas las pláticas, peleas y consejos.

A mis amigos de toda la vida, Fany, Daniel y Annette porque siempre me escucharon y estaban en cada instante para apoyarme y todos sus consejos para seguir adelante y no rendirme.

A mis amigos de la maestría porque hicieron todo más divertido, Clau, Sony, Yolis, Dany, Roque y Héctor.

A Kathy y Carlos por tenerme paciencia y su apoyo también chicos, se los agradezco.

A todo el departamento de Bioquímica por todos sus consejos y el apoyo.

DEDICATORIA

A mi familia por todo su apoyo, por siempre empujarme a dar lo mejor de mí y formarme como persona, ellos son mi todo y mi inspiración para seguir cada día.

A mi novio Augusto, gracias por todo tu apoyo y por siempre escucharme y por estar en esos momentos difíciles y también por aguantarme y tenerme paciencia todo este tiempo que estaba haciendo la tesis.

COLABORACIONES

Dra. en C. Viviana Chantal Zmozosa Signoret

Laboratorio de Biología Estructural

Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular

Dra. en C. Ana María Guadalupe Rivas Estilla

Laboratorio de Infectología Molecular

Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular

Dr. en C. Román Vidal Tamayo

Universidad de Monterrey

M. en C. Alejandro García Ruiz

Laboratorio de Citogenómica y Microarreglos

Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular

TABLA DE CONTENIDO

Abreviaturas	1
Lista de figuras	4
Lista de tablas	6
Resumen	7
Capítulo I. Introducción	8
Capítulo II. Antecedentes	16
Capítulo III. Hipótesis	22
Capítulo IV. Justificación	22
Capítulo V. Objetivo general	24
Capítulo VI. Objetivos específicos	24
Capítulo VII. Materiales y Equipos	25
7.1 Materiales de uso general	25
7.2 Material para cultivo celular	25
7.3 Material para PCR tiempo real	26
7.4 Microarreglo de Expresión	26
7.5 Equipos	26
Capítulo VIII. Metodología	28
8.1 Tipo de estudio	28
8.2 Estrategia experimental	28
8.3 Obtención de cerebros de rata	29
8.4 Inhibición de <i>ZMIZ1</i> mediante ARNi en la línea celular de glioblastoma C6	30
8.5 Extracción de ARN	31
8.6 Retrotranscripción	33
8.7 PCR punto final	33
8.8 PCR tiempo real	35
8.9 Microarreglo de expresión	39
Capítulo IX. Resultados	41
9.1 PCR punto final y tiempo real	41
9.2 Inhibición	48
9.3 Microarreglo de Expresión	54

Capítulo X. Discusión	58
Capítulo XI. Conclusiones	77
Capítulo XII Perspectivas	79
Capítulo XIII Literatura Consultada	80
Capítulo XIV Anexos	97

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico.
ADNc	AND complementario
ARN	Ácido ribonucleico.
ARNi	ARN de interferencia
ARNm	ARN mensajero
ATP	Adenosina trifosfato
BAF	Brm/Brg-associated factor
BDNF	Factor neurotrófico derivado de cerebro
°C	Grados centígrados.
CO ₂	Dióxido de carbono
Ct	Umbral de cuantificación
Cy3	Cyanine-3
Da	Daltons
DI	Discapacidad intelectual
dNTPs	Dsoxirribonucleótidos trifosfatados
DOPA	Dopamina
E-9.5	Embriones de 9.5 días
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGF	Factor de crecimiento epidermal
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidermal
ErbB	Receptor del factor de crecimiento epidermal
FGF2	Factor de crecimiento de fibroblasto 2
FMRP	Fragile X mental retardation protein
G	Gravedades
GNDF	Factor neurotrófico derivado de glia
GPCR	Receptores acoplados a la proteínas G

HCl	Ácido clorhídrico
Hrs	Horas
IGF	Factor de crecimiento tipo insulínico
IGFR	Receptor del factor de crecimiento tipo insulínico
Kb	Kilobases
Log ₂	Logaritmo base 2
Log ₁₀	Logaritmo base 10
m	Pendiente
μM	micromolar
kDa	Kilodaltons
MIZ	MSX-interacting zinc finger
μg	microgramos
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
μL	microlitros
mL	mililitros
mM	Milimolar
NaCl	Cloruro de sodio
nBAF	Neuron-specific chromatin remodeling complex
ng	nanogramos
nM	Nanomolar
PARS	Receptores activados por proteasas
Pb	Pares de bases
PCNA	Antígeno nuclear de proliferación celular
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
P.F	Primer Forward
P.R	Primer Reverse
PRR12	Proline-rich 12
PSP	Proteoma postsináptico

qPCR	PCR tiempo real
RA	Receptor de andrógenos
RD	Retraso en el desarrollo
Rpm	Revoluciones por minuto
RT	Retrotranscripción
RTC	Receptor tirosin cinasa
SLN	Señal de localización nuclear
SN	Sistema Nervioso
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
TGF- β tipo I	Transforming growth factor β
tna	Tonalli
PIAS	Protein inhibitor of activated STAT
VEGFA	Factor de crecimiento endotelial vascular
ZMIZ1	Zinc Finger, Miz-type Containing 1

LISTA DE FIGURAS

Figura	Contenido	Página
1	Proteína <i>ZMIZ1</i>	17
2	Estrategia experimental	28
3	PCR <i>in silico</i> de <i>ZMIZ1</i>	41
4	Geles de extracción de ARN y retrotranscripción de las diferentes etapas del desarrollo de cerebro de rata	42
5	PCR punto final de <i>ZMIZ1</i>	43
6	Gráfico de amplificación y curva de fusión de <i>GAPDH</i> utilizando diferentes concentraciones	44
7	Gráfico de amplificación y curva de fusión de <i>ZMIZ1</i> utilizando diferentes concentraciones	45
8	Gráfico de amplificación y curva de fusión de <i>GAPDH</i> para determinar la expresión relativa	46
9	Gráfico de amplificación y curva de fusión de <i>ZMIZ1</i> para determinar la expresión relativa	46
10	Curvas de calibración de <i>GAPDH</i> y <i>ZMIZ1</i>	47
11	Expresión relativa de <i>ZMIZ1</i> en las diferentes etapas de desarrollo de cerebro de rata	48
12	Expresión relativa de <i>ZMIZ1</i> en las células de glioblastoma C6 de rata	49
13	Células control e inhibidas	50
14	Geles de la extracción y retrotranscripción, tras la inhibición de <i>ZMIZ1</i>	51
15	PCR punto final, tras la inhibición de <i>ZMIZ1</i> a diferentes períodos de incubación.	52
16	Gráficos de amplificación y curvas de fusión de <i>GAPDH</i> y <i>ZMIZ1</i> , tras la inhibición de <i>ZMIZ1</i> a diferentes tiempos de incubación	53
17	Porcentajes de inhibición de <i>ZMIZ1</i> , tras su incubación a diferentes períodos de tiempo	54

18	Imagen del microarreglo de expresión, posterior a la hibridación de las muestras	55
19	Mapa de calor, tras la inhibición de <i>ZMIZ1</i> .	56
20	Correlación entre las muestras inhibidas y no inhibidas	57
21	Vía de señalización de PIK3CA	112
22	Vía de señalización de CBLC	113
23	Vía de señalización de MAT1A	114
24	Vía de señalización de HTR1B	115
25	Vía de señalización de PIK3CA	116
26	Vía de señalización de MAT1A	117
27	Vía de señalización de PIK3CA y CBL-C	118
28	Vía de señalización de PIK3CA y CBL-C	119
29	Vía de señalización de KLK1, P2RX6 y PIK3CA	120
30	Vía de señalización de SYNDG1 y SPZ1	121

Lista de tablas

Tabla	Contenido	Página
1	Características del ARNi id:s166829	30
2	Reactivos utilizados para la PCR punto final	34
3	Condiciones utilizadas para la PCR punto final	35
4	Reactivos para la PCR tiempo real, para la curva de calibración	36
5	Condiciones utilizadas para la PCR tiempo real	37
6	Reactivos utilizados para la PCR tiempo real, para determinar la expresión relativa	38
7	Reactivos utilizados para la PCR tiempo real, tras la inhibición de <i>ZMIZ1</i>	38
8	Rendimiento y actividad específica utilizados para el microarreglo de expresión	110

RESUMEN

Introducción: El desarrollo del SNC es un proceso compuesto de una serie de modificaciones y una compleja expresión de genes espacio-temporal. Aunado a esto, la complejidad anatómica en mamíferos hace que se presenten problemas para el análisis de la función y expresión de los genes. El reto más difícil es el hecho de que hay cientos de tipos de linajes celulares funcionalmente y morfológicamente definidos. Lo que da como resultado que la interpretación de los fenotipos causados por anomalías en el SNC, sea en ocasiones muy difícil de asociar a patologías neurológicas provocadas por la alteración de un gen o grupo de genes. En la actualidad, se tiene un limitado conocimiento sobre los genes y la función de genes involucrados en procesos biológicos en SNC. Por lo tanto, es de vital importancia el descubrimiento de nuevos genes y su función en el SNC. Esto nos permitirá relacionar el origen de diferentes patologías neurológicas descubiertas y aún por descubrir. Tal es el caso de *ZMIZ1*, del cual no se tiene claro su papel en el SNC. Este gen se encontró truncado y fusionado con otro gen debido a una translocación equilibrada *de novo* entre los cromosomas 10 y 19, en una niña con DI y múltiples alteraciones neuropsiquiátricas. **Objetivo:** Analizar la expresión relativa de *Zmiz1* en las diferentes etapas de desarrollo de cerebro de rata, y en el transcriptoma de la línea celular de glioblastoma C6 de rata antes y tras la inhibición de *ZMIZ1* por un ARNi. A partir de los genes diferencialmente expresados en la línea celular, sugerir las posibles vías reguladas por dicho gen en células nerviosas. **Material y Métodos:** Se analizó la expresión relativa de *ZMIZ1* en las diferentes etapas de desarrollo de cerebro de rata (embrión, recién nacido y adulto) y en la línea celular de glioblastoma C6, mediante PCR tiempo real. Se realizó una inhibición de la expresión de *ZMIZ1* en la línea celular de glioblastoma C6, usando un ARNi (específico para *ZMIZ1*) con períodos de incubación de 24, 48 y 72 horas, y mediante PCR tiempo real se determinó el tiempo al cual se obtuvo una mayor porcentaje de inhibición (48 horas), para posteriormente realizar el microarreglo de expresión y determinar los genes con un cambio significativo en su expresión y las vías de señalización afectadas. **Resultados:** *ZMIZ1* presentó una alta expresión en las diferentes etapas de desarrollo, principalmente en embrión. Además, se observó que la expresión de este gen en la etapa adulta y la línea celular de glioblastoma C6 era muy semejante. Con respecto al microarreglo de expresión, se encontraron afectados genes que participan en la modulación de las vías de la serotonina y las aminos, los cuales están involucrados en el comportamiento y padecimientos psiquiátricos. Por otra parte, se vieron implicados genes que regulan la sinapsis, la proliferación y diferenciación de células neuronales y gliales, a través de la activación de AKT y Ras. También *ZMIZ1* está involucrado en la activación de genes relacionados con la metilación y la reparación del ADN. Además, se observó que *ZMIZ1* regula la expresión de antígenos de cáncer de testículo, los cuales son biomarcadores usados para diferentes tipos de cáncer. **Conclusiones:** La inhibición de *ZMIZ1* asimila la haploinsuficiencia esperada de este y mostró solo genes sub-expresados. *ZMIZ1* es un co-activador transcripcional y la inhibición de este, altera la expresión de genes que promueven la proliferación y diferenciación neuronal, y que participan en procesos cognitivos, de memoria a largo plazo y plasticidad sináptica. También, se observaron alterados genes que regulan el comportamiento, a través de los receptores acoplados a las proteínas G y genes que son blancos terapéuticos para neurodegeneración y cáncer.

FIRMA DEL ASESOR: _____

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

El sistema nervioso comunica el organismo con su entorno, debido a que es un intermediario entre el interior y el medio externo. Como instrumento de las sensaciones, ofrece su cooperación indispensable en los fenómenos intelectuales y afectivos; transmite a los músculo el principio de los movimientos voluntarios o involuntarios, preside a las diversas reacciones simpáticas, a los actos nutritivos y secretorios, y domina así, las funciones de la economía en su totalidad (Poirier, 2004).

El sistema nervioso se divide en dos partes anatómicamente diferentes:

- El SNC, incluye todos los nervios que se encuentran en el cráneo y la columna vertebral. Se encarga de integrar y coordinar todas las funciones orgánicas, procesar los mensajes de las neuronas y enviar órdenes a las diversas partes del cuerpo. El SNC envía y recibe los mensajes nerviosos a través de la médula espinal que conecta el encéfalo con el SNP (Gerrig y Zimbardo, 2005).
- El SNP, está conformado por nervios y los ganglios (grupos de cuerpos de células nerviosas) situados fuera del cerebro y la médula espinal. La función del SNP, es proporcionar al SNC la información de los receptores sensoriales y transmitir órdenes del encéfalo a órganos y músculos (Gerrig y Zimbardo, 2005).

Los SNC y SNP están conformados por neuronas (células nerviosas) y células gliales (células de soporte).

Las células nerviosas son responsables de las funciones que son exclusivas del sistema nervioso y se clasifican de acuerdo a su función o estructura. La clasificación funcional se basa en la dirección en la cual conducen impulsos. Las neuronas sensoriales, o aferentes, conducen impulsos desde receptores sensoriales hacia el SNC. Las neuronas motoras, o eferentes, conducen impulsos afuera del SNC, hacia órganos efectores (músculos y glándulas). Las neuronas de asociación o interneuronas se localizan exclusivamente en el SNC y desempeñan las funciones de asociación, o, integración, en el sistema nervioso. Mientras, que la clasificación estructural, se basa en el número de prolongaciones que se extienden desde el cuerpo celular de la neurona. Las neuronas pseudounipolares tienen una prolongación corta que se ramifica como una T, para formar una prolongación más grande. Las neuronas bipolares tienen dos prolongaciones, una en cada extremo; este tipo de neuronas se encuentran en la retina del ojo. Las neuronas multipolares, es el tipo más común, tienen varias dendritas y un axón que se extiende desde el cuerpo celular (Fox, 2011).

Por otro lado, las células gliales, son células no nerviosas, que apoyan y protegen a las neuronas. Aunque, estas células no participan directamente en la transmisión de señales eléctricas en distancias largas, proporcionan un soporte físico y bioquímico importante para las neuronas. Además, provee estabilidad a las neuronas al rodearlas, y soporte metabólico y ayudan a mantener la homeostasis

del líquido extracelular del encéfalo al captar el exceso de metabolitos y K^+ (Gerrig y Zimbardo, 2005).

Las células de la glia se comunican con las neuronas y entre ellas fundamentalmente, a través de señales químicas. Los factores de crecimiento derivados de la glia y los factores tróficos (nutritivos) ayudan a mantener a las neuronas y a guiarlas durante la reparación y el crecimiento. Las células de la glia a su vez responden a los neurotransmisores y los neuromoduladores secretados por las neuronas (Gerrig y Zimbardo, 2005). Es de agregar, que la proliferación tanto de las neuronas como de las células gliales puede ser regulada por señales extracelulares, que actúan como factores de crecimiento o factores de inhibición, que promueven la división celular de células progenitoras, o inhiben la proliferación de éstas, respectivamente (Sanes *et al.*, 2012).

El SNP está conformado por dos tipos de células gliales. Las células de Schwann (también llamadas neurolemocitos) que forman vainas de mielina alrededor de axones periféricos y las células satélite o gliocitos ganglionares, que sostienen cuerpos de células neuronales dentro de los ganglios del SNP (Gerrig y Zimbardo, 2005). Por otro lado, el SNC lo conforman 4 tipos de células gliales, los cuales se dividen en macroglia (oligodendrocitos, astrocitos y ependimarias) , que es de origen neuroectodérmico, y microglia, que es de origen mesenquimal (hematopoyético) (Lane *et al.*, 2007).

Los oligodendrocitos, al igual que las células de Schwann aíslan a los axones al formar la vaina mielina, una sustancia compuesta por múltiples capas concéntricas

de membrana fosfolipídica. Una diferencia entre los oligodendrocitos y las células de Shwann es la cantidad de axones que envuelve cada célula. En el SNC, un oligodendrocito forma mielina alrededor de porciones de varios axones. Mientras, que en el SNP, las células de Shwann se asocian con un solo axón (Gerrig y Zimbardo, 2005)

Los astrocitos son células muy ramificadas que hacen contacto con las neuronas y los vasos sanguíneos, y pueden transferir nutrientes entre ambos. Además, estas células ayudan a mantener la homeostasis en el SNC al captar K^+ desde el líquido extracelular, esta función es muy importante en el mantenimiento del ambiente iónico apropiado para las neuronas (Gerrig y Zimbardo, 2005). Los astrocitos también captan neurotransmisores liberados por las terminaciones axonales de las neuronas, un ejemplo es el glutamato, una vez que este es liberado por las neuronas, es captado por los astrocitos, para transformarlo en glutamina y ser liberado de regreso hacia las neuronas, para que éstas lo transformen en glutamato. Es importante destacar, que los astrocitos participan en la formación de sinapsis, la regulación de neurogénesis en el cerebro adulto e inducen la formación de la barrera hematoencefálica y liberan sustancias químicas transmisoras que pueden estimular o inhibir neuronas (Fox, 2011).

Las células endoteliales, revisten los ventrículos del cerebro y el conducto central de la médula espinal y crean una capa epitelial con permeabilidad selectiva (el epéndimo) que separa los compartimientos líquidos del SNC (Gerrig y Zimbardo, 2005; Fox, 2011). El epéndimo es la fuente de las células troncales o células

madres nerviosas inmaduras que pueden diferenciarse en neuronas o células de la glía (Gerrig y Zimbardo, 2005).

La microglia son células inmunitarias especializadas que residen de forma permanente en el SNC. Cuando son activadas, fagocitan agentes patógenos e invasores extraños y elimina células dañadas (Gerrig y Zimbardo, 2005; Fox, 2011).

Daños en el SN o en regiones del cerebro, pueden dar lugar a alteraciones en las funciones del SN o causar desordenes psicológicos (Megler *et al.*, 1998).

Los problemas de salud mental afectan a la sociedad en su totalidad, y no sólo a un segmento limitado o aislado de la misma y por lo tanto, constituyen un desafío importante para el desarrollo general (OMS, 2004). Cerca de 450 millones de personas sufren de un trastorno mental o de la conducta. Cuatro de las 6 causas principales, de los años vividos con discapacidad, resultan de trastornos neuropsiquiátricos (depresión, trastornos generados por el uso de alcohol, esquizofrenia y trastorno bipolar). Una de cada cuatro familias tiene por lo menos un miembro afectado por un trastorno (OMS, 2004).

Cerca de la mitad de los trastornos mentales se manifiestan antes de los 14 años. Se calcula que aproximadamente el 20% de los niños y adolescentes del mundo tienen trastornos o problemas mentales. Los trastornos neuropsiquiátricos figuran entre las principales causas de discapacidad entre los jóvenes (OMS, 2015).

Prácticamente todos los trastornos cerebrales pueden causar síntomas psiquiátricos. Los trastornos neuropsiquiátricos se deben al mal funcionamiento de

las neuronas (en específico de su sinapsis) y de las células gliales (Yamamuro, *et al.*, 2015); muchos de estos trastornos surgen por aberraciones en los mecanismos de desarrollo neurológico, traumatismos cerebrales, tumores, enfermedades auto inmunes y degenerativas, consumo de sustancias tóxicas, desequilibrio metabólico y condiciones genéticas (Muñiz, 2015).

Debido a que la arquitectura anatómica y funcional del cerebro es principalmente determinada por los procesos transcripcionales durante la etapa prenatal, el cerebro humano sigue un complejo desarrollo, altamente estereotipado por una serie de eventos que dependen de la expresión diferencial regulada por genes. Por lo tanto, alteraciones adquiridas o heredadas pueden tener diversas consecuencias (Miller, *et al.*, 2014). Por ejemplo, las translocaciones cromosómicas, que son reacomodos del ADN, que implica el movimiento de material genético entre cromosomas no homólogos o en el mismo cromosoma. Los cromosomas reacomodados se llaman cromosomas derivativos. Hay dos tipos de translocaciones: translocaciones de Robertson y recíprocas (Cunningham, *et al.*, 2011).

Las translocaciones robertsonianas, se producen cuando los brazos largos de dos cromosomas acrocéntricos individuales, como los cromosomas 13 y 14, se fusionan en el centrómero para formar un cromosoma derivativo. La fusión en los centrómeros conduce a la pérdida de un centrómero y las regiones satélite que comprenden los brazos cortos de cada cromosoma (el cromosoma pequeño se pierde). Las regiones satélites sólo contienen genes que codifican ARN ribosómico, que también está presente en múltiples copias en otros cromosomas

acrocentricos. Siempre y cuando los brazos fusionados largos permanezcan intactos, el portador de la translocación casi siempre tiene un fenotipo normal (Pierce, 2009; Cunningham, *et al.*, 2011).

Por su parte, las translocaciones recíprocas, son un reacomodo de material cromosómico en el que hay roturas en dos cromosomas distintos y los fragmentos se intercambian antes de la reparación de las roturas.

Las translocaciones pueden ser no balanceadas y balanceadas. En las translocaciones no balanceadas, el material genético se mueve de un cromosoma a otro, sin que exista intercambio recíproco. En las translocaciones balanceadas o equilibradas, existe intercambio entre un cromosoma y otro, pero no se gana, ni se pierde material cromosómico (el material genético se conserva, pero en diferentes cromosomas). Es poco probable que las translocaciones balanceadas afecten al individuo que la porta, pero de lo contrario pueden llevar a un retraso en el desarrollo (RD) o discapacidad intelectual (DI) con o sin rasgos clínicos adicionales (Pierce, 2009; Cunningham, *et al.*, 2011). El fenotipo de los portadores de estas translocaciones puede ser causado por la interrupción de genes sensibles a dosis o haploinsuficiencia (el producto de un gen, no es suficiente para el desarrollo normal, es decir se necesitan de las dos copias de ese gen), (Willems, 2004) fusiones de genes truncados que expresan transcritos híbridos patogénicos, efectos de posición que afectan a genes cercanos o reordenamientos adicionales relacionados o no con el punto de ruptura de la translocación. Las translocaciones equilibradas *de novo* tienen una incidencia de aproximadamente 1/2,000 nacidos vivos.

A través, del estudio de los puntos de ruptura de diversas translocaciones equilibradas se han identificado algunos genes autosómicos candidatos para DI. De hecho, se estima que más 2,000 genes autosómicos, entre los cuales la mitad codifica para proteínas del proteoma postsináptico (PSP) pueden estar involucrados con DI o trastornos neuropsiquiátricos. No obstante, se estima que alrededor de 10,000 genes se expresan en SNC (Ropers, 2007), los cuales son potenciales candidatos a conducir también a alteraciones neurológicas.

CAPÍTULO II

ANTECEDENTES

Como antecedente directo, Córdoba-Fletes y cols., (2015) reportaron por primera vez, una translocación equilibrada *de novo* entre los cromosomas 10 y 19, que dio lugar a la interrupción y fusión de genes relacionados con la remodelación de la cromatina *ZMIZ1* (del inglés Zinc Finger, Miz-type Containing 1) y *PRR12* (del inglés Proline-rich 12) en una niña con DI y múltiples alteraciones neuropsiquiátricas. Esta fusión provocó la formación de un transcrito híbrido, que da como producto una proteína trunca. Es importante agregar, que ellos reportaron por primera vez la interacción de *ZMIZ1* con Brg1 en cerebro. Brg1 es una subunidad del complejo de remodelación de la cromatina específico de neuronas (nBAF), y este a su vez interacciona con el complejo AP-1, los cuales juegan un papel importante en la regulación de la actividad de genes esenciales para la sinapsis normal, el crecimiento y comportamiento de las dendritas. La paciente también presentaba ciertas características (DI, convulsiones, cabello canoso desde la niñez, problemas de visión, sinofris, hirsutismo y deformidad del pie) del síndrome de Coffin-Siris, el cual es causado por mutaciones en *SMARCA4* (Brg1). Además, ellos sugieren que la haploinsuficiencia de *ZMIZ1* y *PRR12*, se sobrelapa con la deficiencia de FMRP (proteína de retraso mental X frágil), ya que tanto *ZMIZ1*, como *PRR12* son blancos de esta proteína, que regula la traducción (a través de la unión a ARN mensajeros), de proteínas relacionadas con plasticidad sináptica.

Puesto que aún no está de toda clara la participación de *ZMIZ1* en el sistema nervioso, ni su impacto neuropatológico, en esta tesis nos enfocamos en realizar un modelo para estudiar los efectos de haploinsuficiencia sobre este gen e identificar indirectamente sus genes y vías diana de regulación en células nerviosas.

El gen *ZMIZ1* (también conocido como *KIAA1224*, *RA117* o *Zimp10*), localizado en el locus 10q22.3 en humanos, se ha identificado como un cofactor de transcripción perteneciente a la familia de las PIAS (Protein inhibitor of activated STAT). Los miembros de la familia PIAS comparten un alto grado de similitud en su secuencia y se caracterizan por la presencia de dominios de dedos de zinc, llamados Miz (MSX-interacting zinc finger). Este motivo es importante, ya que interacciona con sus proteínas blanco y presenta una alta similitud con el dominio RING presente en la E3ubiquitina ligasa, debido a su rol implicado en la vía de sumoilación (Beiliakoff-Jason et al., 2008). Además, la proteína *ZMIZ1* tiene un potente dominio transactivador en la región C-terminal rica en prolina, la cual parece ser autorregulada por su dominio N-terminal; también presenta una señal de localización nuclear (SLN) (Figura 1). La proteína canónica *ZMIZ1* (en humanos) tiene un peso molecular de 115.4 kD y posee 1,067 aminoácidos.

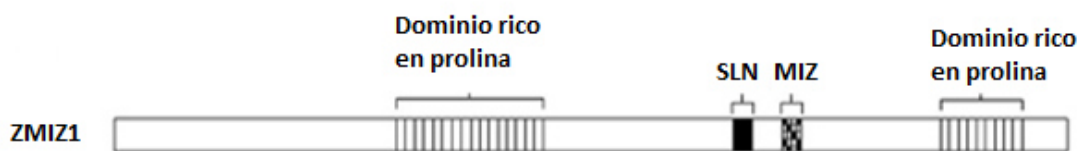


Figura 1. Proteína ZMIZ1. Esquema que representa, los dominios que conforman a la proteína (dos dominios ricos en prolina, una señal de localización nuclear o SLN y el dominio MIZ.).

Las proteínas PIAS regulan la actividad transcripcional de las Smads, las cuales son sustratos del receptor TGF- β tipo I (Transforming growth factor β) y son responsables de la transducción de señales que van desde el receptor hacia genes blancos en el núcleo. El receptor TGF- β juega un papel crítico en el control de la proliferación celular, diferenciación y apoptosis. Consistente con esto, Xiaomeng y cols., (2006) demostraron que Zmiz1 era responsable de la inducción de TGF- β , a través, de su interacción con Smad3 (dependiente de Smad4) y Smad4.

Además, de la participación de ZMIZ1 como co-regulador de la actividad de las Smads, también se le ha visto involucrado en la activación de diversos conjuntos de factores de transcripción, tales como p53, y el receptor de andrógenos (RA). El RA, el cual es un factor de transcripción inducido por ligandos, presenta colas de poliglutamina dentro de su dominio de trans-activación en la región N-terminal. La longitud de las colas de poliglutamina, se ha observado que altera la actividad transcripcional del RA en cáncer de próstata. Xiaomeng y cols., (2011) evaluaron el papel de ZMIZ1 como co-activador, en la regulación de la actividad del RA, el cual presentaba diferentes colas de poliglutamina como RAQ9, RAQ24 y RAQ35 en líneas celulares de cáncer de próstata. Ellos observaron una fuerte interacción proteína-proteína entre ZMIZ1 y RAQ9. También observaron que en presencia de ZMIZ1 la interacción entre las regiones N y C-terminal era más pronunciada en

RAQ9 que en RAQ24 y RAQ35, y esta interacción permite el reclutamiento de co-reguladores transcripcionales que le confieren actividad transcripcional (Saitoh, 2002). Además, Palazzolo y cols., (2008) observaron una correlación inversa entre la longitud de la cola de poliglutamina y la actividad transcripcional del RA en pacientes con cáncer de próstata (2008). Xiaomeng y cols. (2011) e igualmente, observaron que Brg1 y BAF57, los cuales son componentes del complejo del factor asociado a Brm/Brg (BAF “Brm/Brg-associated factor”), están involucrados en aumentar la actividad de ZMIZ1 sobre el RA. El complejo BAF (homólogo del complejo Swi/Snf que se encuentra en levaduras), se ha observado que tiene un papel importante en el neurodesarrollo, ya que está involucrado en la plasticidad neuronal (estructural/funcional) y en la formación de la memoria (Choi, *et al.*, 2014). Recientes hallazgos indican que también contribuye en funciones cognitivas en el cerebro adulto y alteraciones en este complejo provocan desórdenes mentales, los cuales son representados como discapacidad intelectual en humanos (Choi, *et al.*, 2014). Entre los complejos que conforman BAF se encuentra el complejo específico de neurona (nBAF “neuron specific chromatin remodeling complex”), el cual parece interaccionar con ZMIZ1 en cerebro de ratón (Córdova-Fletes, y cols., 2015). El nBAF en cooperación con CREST (coactivador transcripcional), regula la expresión de genes que son esenciales para el crecimiento de dendritas, dependientes de actividad sináptica (Wu, *et al.*, 2007).

El complejo SWI/SNF juega un papel importante en distintos procesos, tales como, transcripción, diferenciación celular y reparación del ADN. En este sentido, *ZMIZ1* es un ortólogo de *tna* (Tonalli) en *Drosophila melanogaster*.

Aunque la función neuronal específica de *ZMIZ1* no está definida, su ADNc se aisló inicialmente de tejidos humanos fetales cerebrales (Nagase y cols., 1999). También, se ha observado una alta expresión de *ZMIZ1* en corazón, ovario, tejido craneofacial y en la amígdala de cerebro (Córdova-Fletes y cols., 2015). Posteriormente, su ARN mensajero se identificó como un blanco para FMRP (Fragile X mental retardation protein), la cual causa el síndrome X frágil, dando lugar a discapacidad intelectual. Se ha observado que ratones Knockout para el gen *FMRP* presentan algunas características similares a los pacientes con síndrome X frágil, incluyendo espinas dendríticas inmaduras, hiperactividad, déficit de aprendizaje y memoria (Qin, *et al.*, 2002). FMRP es una proteína que se une a los ARNm y se cree que está relacionada con la regulación traduccional de múltiples proteínas probablemente implicadas en la plasticidad sináptica (Darnell y cols., 2011; Córdova-Fletes y cols., 2015). Que se cree que podría ser el caso de *ZMIZ1* (Córdova-Fletes y cols., 2015)

Zmiz1 de ratón comparte una similitud del 97% con respecto al humano y en rata un 90%. Durante etapas tempranas del desarrollo se ha observado que se expresa en el sistema vascular (aorta dorsal y en el alantoides) y en tejido neural, pero en este último, se ha observado que a partir de la etapa 12.5 su expresión disminuye (Rodríguez-Magadán y cols., 2008). Adicionalmente, se ha reportado que está involucrado en las vías de señalización que permiten el desarrollo del embrión, incluyendo el sistema nervioso central (Rodríguez-Magadán y cols., 2008; Córdova-Fletes y cols., 2015).

Jason Beliakoff y cols., (2008) reportaron que ratones embrionarios que presentaban un silenciamiento total del gen *Zmiz1*, morían aproximadamente en el día 10.5. Además, observaron que los ratones embrionarios presentaban anemia, retardo en el crecimiento y graves defectos en la vascularización del saco vitelino en la etapa E-9.5. Se concluyó que los defectos en la vascularización fueron causados por que *Zimz1* regula la transcripción del gen *Fra-1*, el cual pertenece a la familia *Fos* y está involucrado en el desarrollo vascular. Por lo tanto, se dedujo que *ZMIZ1* era importante para el desarrollo y la sobrevivencia del embrión.

CAPITULO III

HIPÓTESIS

Zmiz1 presenta una diferencia significativa entre los niveles de expresión en las diferentes etapas de desarrollo en cerebro de rata, presentando una mayor expresión durante el desarrollo embrionario y conforme el organismo se desarrolla, hay una declinación en la expresión de este. Asimismo, y debido a su presencia durante el desarrollo neuronal, su inhibición por un ARN de interferencia (ARNi) conduce a cambios en la expresión de genes relacionados al desarrollo de sistema nervioso.

CAPITULO IV

JUSTIFICACIÓN

Se estima que alrededor de 10,000 genes se expresan en SNC (Ropers, 2007), los cuales son potenciales candidatos a conducir a alteraciones neurológicas. Entre estos genes se encuentra *ZMIZ1*, el cual se encontró truncado por primera vez, debido a una translocación equilibrada de *nov*, en una paciente que presentaba DI, retraso en el desarrollo y múltiples alteraciones neuropsiquiátricas (Córdova-Fletes *et al.*, 2015).

La poca información sobre *ZMIZ1* en el SNC, nos insta a generar un modelo de estudio que nos permita dilucidar su papel en el neurodesarrollo e identificar las vías de señalización en las que participa. Eventualmente, esto nos permitirá

relacionar el origen de diferentes patologías neurológicas conocidas y aún por conocer, así como deducir sus efectos sobre el SNC cuando su expresión es disminuida.

CAPITULO V

OBJETIVO GENERAL

Analizar la expresión relativa de *Zmiz1* en las diferentes etapas de desarrollo de cerebro de rata, y en el transcriptoma de la línea celular de glioblastoma C6 de rata antes y tras la inhibición de *ZMIZ1* por un ARNi. A partir de los genes diferencialmente expresados en la línea celular, sugerir las posibles vías reguladas por dicho gen en células nerviosas.

CAPITULO VI

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar los niveles de expresión de *Zmiz1* en las diferentes etapas de desarrollo (embriones de 14-15 días, recién nacidos y adultos entre 3 -5 meses) en cerebro de rata, para ponderar su expresión relativa en el desarrollo, así como en la línea celular de glioblastoma C6 de rata.
2. Analizar los perfiles de expresión génica global y los genes diferencialmente expresados, tras la inhibición de la expresión de *Zmiz1* en la línea celular de glioblastoma C6 de rata.
3. Determinar las posibles rutas metabólicas en las que participa *Zmiz1*, a partir de los genes diferencialmente expresados tras la inhibición.

CAPITULO VII

MATERIALES Y EQUIPOS

Este proyecto se realizó en el Laboratorio de Citogenómica y Microarreglos, del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular, de la Facultad de Medicina, de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

7.1 Materiales de uso general

Se utilizaron micropipetas de la marca Eppendorf Research Plus, con capacidad para diferentes volúmenes que van desde 100 a 1000 μL , 20 a 200 μL , 10 a 100 μL , 2 a 20 μL , 0.5 a 10 μL , 0.1 a 2.5 μL . Puntillas desechables con y sin filtro para cada respectiva micropipeta de 1000 μL , 200 μL y 10 μL , de la marca Vertex y SSI, respectivamente. Además, se utilizaron tubos de plásticos de la marca Corning de 15 mL y 50 mL, toallas desechables marca Kimberly Clark y microtubos de 2, 1.5 y 0.2 mL.

7.2 Material para cultivo celular

Se usaron pipetas serológicas de la marca Nunc que abarcan volúmenes de 10 y 5 mL. Para el cultivo de las células de glioblastoma C6 se utilizaron placas de Petri de 150 mm, botellas de cultivo con rosca de 15 cm^2 y placas de 24 pozos, de la marca Nunc. Mientras, que para el almacenamiento de las células a -80 o -20°C , se utilizaron crioviales de marca Corning de 2 mL.

7.3 Material para PCR tiempo real

Se utilizaron tubos y tapas de Applied Biosystems, los cuales tienen una presentación en forma de tiras de 8 tubos y de 8 tapas.

7.4 Microarreglo de expresión

Se usó el microarreglo SurePrint G3 Rat GE 8x60K perteneciente a la marca de Agilent Technologies.

7.5 Equipos

Se usó el congelador vertical -80°C de la marca So-Low, para el almacenamiento de la células de glioblastoma C6. Para centrifugar se utilizó la microcentrifuga 5415, marca eppendorf y el Minispin, marca labnet. Para homogenizar se utilizaron el vortex y la plancha de calentamiento, ambas de la marca Thermolyne. Por otro lado, para el manejo de ácidos nucleicos, se utilizó el Nanodrop 2000 marca Thermo Scientific, la cámara de electroforesis Mini-Sub cell GT y su fuente de poder Power Pac Basic, ambas de la marca Bio-rad. Para la visualización de los geles y su preparación, se utilizó el fotodocumentador ChemiDoc XLR⁺, marca Bio-rad y el horno de microondas marca LG. Para realizar PCR punto final y manejar ácidos nucleicos, se utilizó la campana marca UVP, y el termociclador SureCycler 8800, marca Agilent Technologies. Mientras, que para PCR tiempo real, se utilizó el termociclador 7500 fast, marca Applied Biosystems. El equipo usado para cultivo celular fue el microscopio invertido marca Olympus y el pipetor Pipet-Aid XP marca Drummond, la campana de flujo laminar LV-1200, marca Limistell y la incubadora con fuente de CO₂. Mientras, que para el microarreglo de

expresión se usó el escáner SureScan, de la marca Agilent Technologies, y los softwares Agilent Feature Extraction y GeneSpring v14.5.

8.3 Obtención de cerebros de rata

Las ratas utilizadas se mantuvieron en condiciones controladas, con comida y agua *ad libitum* y ciclos de luz y oscuridad de 12 horas. Para obtener los cerebros de las diferentes etapas de desarrollo (embrión de 14-15 días, posnatal de horas, adultos entre 2 a 5 meses), a partir de las ratas de la raza Wistar Kyoto, se utilizaron hembras y machos que fueron colocados en cajas por 24, 48 horas y por tiempo indefinido (hasta el nacimiento de las crías), para permitir su copulación. Los embriones de 15 días fueron obtenidos de las hembras encerradas por 48 horas con los machos. Mientras que los cerebros de rata en etapa posnatal se obtuvieron de machos y hembras encerrados por tiempo indefinido en la misma jaula. Por último, los cerebros de adulto se obtuvieron de las madres y padres de los embriones y recién nacidos.

Para obtener el cerebro, las ratas se sacrificaron, mediante decapitación con guillotina o tijeras de disección, en el caso de las ratas preñadas se les realizó un corte en el abdomen con el fin de exponer al útero y los sacos de embriones, y se descartaron aquellos embriones que presentaron anomalías. Una vez obtenidos los cerebros, estos fueron recolectados en solución salina (NaCl 0.9%). A los cerebros obtenidos se les realizó un corte sagital para obtener el hemisferio izquierdo y el hemisferio derecho, y estos se almacenaron en tubos falcon de 15mL libres de nucleasas a -80°C hasta su uso. Las muestras se tomaron por triplicado, es decir se tomaron 3 hemisferios derechos o izquierdos de cada una de

las etapas a analizar, utilizando cualquiera de los hemisferios para realizar PCR tiempo real.

8.4 Inhibición de *ZMIZ1*, mediante ARNi en la línea celular de glioblastoma (C6)

Para la inhibición de *ZMIZ1* se usó el ARNi id: s166829 (Ambion, ThermoFisher) prediseñado, el cual reconoce los exones 12 (isoforma 1) y 13 (isoformas 2 y 3).

Id ARNi	Secuencia NCBI	Exón y Posición
s166829	NM_001108393.1	13 (posición 2026)
	XM_006252537.2	12 (posición 14537)
	XM_006252538.2	13 (posición 2073)
	XM_006252539.2	13 (posición 2091)

Tabla 1.- Características del ARNi id: s166829. Secuencias, exones y posiciones exactas que reconoce.

Se utilizaron 3 cultivos celulares independientes de la línea celular Glioblastoma (C6) de rata, las células crecieron en botellas de cultivo (Nunc) a 37°C a 5% de CO₂ en la incubadora (NuAire) en medio DMEM suplementado. Una vez alcanzado un 90% de confluencia se recolectaron en tubos de 15mL (Corning), pero previo a la recolección, se incubaron por 5 minutos con 5mL de tripsina/EDTA (0.25%, Gibco) y posterior a la recolección se agregaron 5mL de medio DMEM

suplementado en los tubos de 15mL para inactivar la tripsina, esto para evitar que las células murieran y posteriormente se centrifugaron a 2500g (Centrifuga CL30R, Thermo) a temperatura ambiente, y el sobrenadante se decantó y se efectuó un lavado con medio de cultivo para eliminar restos de tripsina.

Se realizó conteo celular, pero previo al conteo, el pellet obtenido de la centrifugación se resuspendió en 4mL de medio de cultivo. Se utilizó una relación 3:6.1 de suspensión celular, medio de cultivo sin células y azul tripano (este colorante nos permitió evaluar la viabilidad celular) para realizar el conteo, el cual se hizo en la cámara de Neubauer (en los 4 cuadrantes utilizados para el conteo de los glóbulos blancos). Posterior al conteo se realizaron los siguientes cálculos: primero se determinó el promedio de los 4 cuadrantes, una vez obtenido el promedio este se multiplicó por el factor de dilución, que en este caso fue 8 y luego el resultado se multiplicó por el factor de la cámara de Neubauer, el cual es 10,000 y el producto obtenido de la multiplicación nos indicó el número de células por mililitro.

Se formaron complejos entre el agente lipofectante (utilizando 1 μ L de siPORT NeoFX de Ambion) y los ARNi (utilizando una concentración de 5nM). Se realizó la lipofección en 24 pozos, donde cada pozo contenía 40,000 células, todo se llevó a cabo siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante de siPORT NeoFX. Se cambió el medio cada 24 horas, y las células se recolectaron a las 24, 48 y 72 horas.

8.5 Extracción de ARN

Para la obtención de ARN se lisaron las células con 500µL de la solución de lisis QIAzol (QIAGEN), pipeteando vigorosamente. Se recolectaron los 500µL de cada pozo en tubos de 2mL (SSI) y se agregó de nuevo 500µL de QIAzol en cada pozo de la placa de 24 pozos, posteriormente se mezcló mediante vortex (Thermolyne) por 30 segundos a máxima potencia, todo esto se efectuó en la campana de flujo LV-120 (Lumistell), para evitar contaminación.

A partir los hemisferios de rata (embriones de 7.5 días y de 14-15 días, posnatal y adulto) se extrajo el ARN total. Todas las muestras se hicieron por triplicados biológicos, para ello primero se lisaron las células con 1mL de QIAzol (QIAGEN), las muestras con QIAzol se colocaron en un homogeneizador vidrio-vidrio para ser trituradas mecánicamente, una vez homogenizados los cerebros se recolectaron en tubos de 2mL (SSI) y los tubos se sometieron a agitación en un vortex por 30 segundos a máxima potencia. Debido a que los hemisferios de rata adulta son más grandes, del homogenizado total se tomarón 100µL y se diluyó en 1mL de QIAzol para extraer el ARN total.

Una vez lisadas las células, las muestras fueron procesadas mediante RNeasy lipid Tissue mini kit (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del fabricante, como paso final, las muestras se hidrataron con 45µL de agua libre de nucleasas, en el caso del ARN obtenido de los hemisferios (izquierdo o derecho) y en 25µL para las células C6 para el ARN obtenido tras inhibición con el ARNi.

Se cuantificó mediante Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) el ARN total obtenido y además, se evaluó su calidad e integridad, utilizando un gel de agarosa (UltraPure, Invitrogen) al 2%, el cual se tiñó con SYBR Safe (Invitrogen) antes de cargar las muestras; el gel se corrió a 90v (fuente de poder power pac basi, Bio-Rad) por aproximadamente 90 minutos, en la cámara de electroforesis (Mini-Sub cell GT, Bio-Rad) y una vez terminada la corrida, el gel se observó en el fotodocumentador (Chemidoc XRS⁺ de Bio-Rad). Las bandas se analizaron con el software Image Lab. Todas las muestras se almacenaron a -80°C hasta su uso.

8.6 Retrotranscripción

Siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante y utilizando la enzima SuperScript III (Invitrogen), se retrotranscribió 1µg de ARN total en ADNc, en un volumen final de 20µL, utilizando el termociclador SureCycler 8800 (Agilent Technologies). La concentración de ADN se determinó mediante el Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) y la integridad se evaluó mediante un gel de agarosa al 2%, teñido con SYBR Safe (Invitrogen), el cual se corrió a 90v por aproximadamente 90 minutos, en la cámara de electroforesis. El ADNc se almacenó a -20°C (Torrey).

8.7 PCR punto final

Se realizó una PCR punto final para verificar la correcta amplificación de los primers (IDT). La amplificación se realizó en el termociclador SureCycler 88000 (Agilent Technologies), utilizando el ADNc de solo uno de los triplicados biológicos

de las muestras de embrión, recién nacido y adulto, y usando el siguiente par de primers:

Primer Forward: 5' CTCAACTCCATGAGCTCCAT 3'

Primer Reverse: 5' GGAGGCTGATTGGTGTCTG 3',

Los cuáles son primers prediseñados por Integrated DNA technologies; se eligieron porque reconocen las 3 isoformas predichas de *ZMIZ1* (amplifican entre los exones 12 y 13), dando como resultado un producto de 98pb.

Las concentraciones y las temperaturas que se usaron para la PCR se muestran a continuación en la tabla 2 y 3.

Tabla 2.- Reactivos y concentraciones utilizados para la PCR Punto Final.

Reactivo	Concentración y volumen final
Buffer PCR	1x
MgCl ₂	1.5mM
dNTP's	0.2mM
Primers	0.2mM
Taq Polimerasa	0.04U
ADNc	2μL
Agua	Completar hasta obtener un volumen final de 50 μL

Tabla 3.- Condiciones utilizadas para la PCR punto final: Pasos, temperaturas, tiempos y ciclos utilizados durante la PCR punto final.

Paso	Temperatura	Tiempo	# de ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	3 minutos	1
Desnaturalización	94°C	30 segundos	40
Alineamiento	60°C	45 segundos	40
Extensión	72°C	60 segundos	40
Extensión final	72°C	10 minutos	1

Las muestras se cargaron en un gel de agarosa al 2%, para verificar el tamaño del producto amplificado y se utilizó un marcador de peso molecular que abarca de 100pb a 1500pb (Invitrogen). Previo a cargar las muestras, el gel se tiñó con SYBR Safe (Invitrogen) y las muestras se corrieron a 90v por aproximadamente 90 minutos, en la cámara de electroforesis.

8.8 PCR tiempo real

Una vez verificada la amplificación del producto deseado, se procedió a realizar dos curvas de calibración, una para *GAPDH* y otra para *Zmiz1*, estas curvas de calibración abarcaron concentraciones de 1000ng, 200ng, 40ng y 8ng (las diferentes concentraciones se realizaron por triplicado), esto con el fin de determinar la concentración de ADN óptima para la amplificación y la eficiencia de la amplificación. Estas curvas se realizaron a partir del ADNc, obtenido de

cualquiera de los dos hemisferios de neonatos. Los primers utilizados para *Zmiz1* son los mismos que se usaron para la PCR punto final. Los primers para *GAPDH* son prediseñados (IDT), los cuales hibridan en el exón 1 del ADNc de *GAPDH* de rata según la secuencia de referencia NM_017008 (NCBI) y amplifican un fragmento de 165pb.

Secuencia de los primers que se utilizaron para amplificar *GAPDH*

Primer Forward: 5´ CCAGTAGACTCCACGACATAC 3´

Primer Reverse: 5´ AACCCATCACCATCTTCCAG 3´

Para la amplificación en tiempo real se utilizó el equipo 7500 Fast (Applied Biosystems). En las tablas 4 y 5 se muestran las cantidades y temperaturas utilizadas, respectivamente.

Tabla 4.- Reactivos y volúmenes utilizados para la PCR tiempo real: Para las curvas de calibración.

Reactivo	Concentraciones y volúmenes
SYBR GreenER 2x	10µL
Primer Forward 10µM	1µL
Primer Reverse 10µM	1µL
ADNc	1000ng, 200ng, 40ng y 8ng
Agua	Completar hasta obtener un volumen final de 20 µL

Tabla 5.- Condiciones utilizadas para la PCR tiempo real, Pasos, temperaturas, tiempo y ciclos utilizados para la PCR tiempo real.

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Activación de la Taq polimerasa	50°C	2 minutos	1
Desnaturalización inicial	95°C	10 minutos	1
Desnaturalización	95°C	15 segundos	40
Extensión	60°C	60 segundos	40

Se determinó la eficiencia de los primers, graficando los Ct promedios (de las diferentes concentraciones) versus el Log_{10} de las diferentes concentraciones de ADNc (1000ng, 200ng, 40ng y 8ng), obteniendo la ecuación de la recta. Se utilizó la pendiente para determinar la eficiencia mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Eficiencia} = 10^{-1/m}$$

Se realizó un análisis de expresión diferencial en los cerebros de rata en sus diferentes etapas de desarrollo con los primers para *Zmiz1* y *GAPDH*. Además, todas las muestras de ADNc a utilizar estaban a una concentración de 200ng. Se usó el equipo 7500 Fast (Applied Biosystems) para la amplificación en tiempo real. En la tabla 6 se muestran las cantidades que se utilizaron.

Tabla 6.- Concentraciones que se utilizaron para la PCR tiempo real: Para determinar la expresión relativa de *ZMIZ1*.

Reactivo	Concentraciones y volúmenes
SYBR GreenER 2x	10µL
Primer Forward 10µM	1µL
Primer Reverse 10µM	1µL
ADNc	200ng
Agua	Completar hasta obtener un volumen final de 20µL

Para el análisis de inhibición de *Zmiz1* se utilizaron 200ng de ADNc, para poder apreciar mejor la inhibición. En la tabla 7 se muestran las concentraciones y reactivos utilizados.

Tabla7.- Reactivos utilizados para la PCR tiempo Real tras la inhibición de las células glioblastoma (C6).

Reactivos	Concentración y volúmenes
SYBR GreenER 2x	10µL
Primer Forward 10µM	1µL
Primer Reverse 10µM	1µL
ADNc	300ng
Agua	Completar hasta obtener un volumen final de 20µL

Todas las muestras se sometieron a los mismos pasos, temperaturas y tiempos que se muestran en la tabla 3.

Una vez que se obtuvieron los Cts de las muestras de los hemisferios de las diferentes etapas de desarrollo de cerebro de rata, se procedió a calcular los $\Delta\Delta Ct$ de las muestras mediante Excel (Microsoft Office, 2013) y se determinó si había una diferencia significativa mediante el uso del Software SPSS y GraphPad prism7 usando el análisis estadístico de Anova y el post hoc de bonferroni, tomando como estadísticamente significativo una $P \leq 0.05$.

Se calcularon los porcentajes de inhibición de *Zmiz1* en la línea celular C6 de glioblastoma (C6) de rata y se compararon los ΔCt de las muestras transfectadas ya sea con el ARNi, con el control negativo o muestras sin transfectar, mediante el uso del software Excel (Microsoft Office, 2013) y para su análisis e interpretación se usó el software GraphPad Prism 7.

8. 9 Microarreglos de expresión

Una vez verificada la inhibición de *Zmiz1* en la línea celular de glioblastoma (C6), se procedió a realizar un microarreglo de expresión de un color (Low Input Quick Amp Labeling Kit, Agilent Technologies).

Se utilizaron las muestras que presentaban una mayor inhibición (ARNi contra *Zmiz1*) y las células transfectadas con el control negativo, estas muestras fueron procesadas siguiendo el protocolo sugerido por Agilent Technologies con el Low Input Quick Amp Labeling Kit (Agilent Technologies), en donde el ARN se convirtió en ADNc, y se realizó una retrotranscripción para obtener ARNc. Las

cadena del ARNc quedaron marcadas con el marcador fluorescente Cyanine 3 (Cy3 Rojo).

El ARNc se purificó, fragmentó y se hibridó en un microarreglo de expresión de rata de 8 muestras, que posee 60,000 sondas por muestra (SurePrint G3 Rat GE 8x60k), para la hibridación el microarreglo se incubó en un horno rotatorio (Shel Lab) a 65°C por 17 horas.

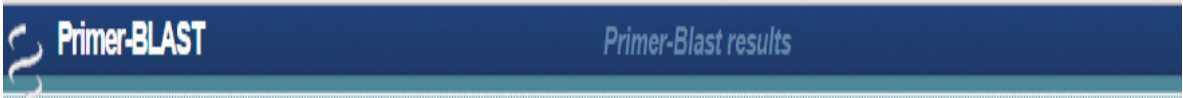
Una vez pasadas las 17 horas, se procedió a lavar y escanear el microarreglo mediante la plataforma Sure Scan (Agilent Technologies) y se obtuvo una imagen en blanco y negro con el mapa de puntos del microarreglo, la imagen se procesó con el software Agilent Feature Extraction, a partir del cual se obtuvo una imagen a color de los spots del microarreglo, también un análisis de control de calidad y los archivos. ".txt". En estos archivos se encuentran los valores numéricos que indican la intensidad de cada sonda en \log_2 , estos fueron procesados con el software GeneSpring, para realizar el análisis de significancia biológica ($P \leq 0.01$, prueba T y con corrección Benjamini-Hoechberg). Una vez obtenidos los resultados se tomaron aquellos datos que pasaron el análisis significativo ($P \leq 0.01$) y además que presentan un cambio significativo en su nivel de expresión (sondas que presenten un nivel de expresión mayor a dos o la mitad de los controles) para a partir de estos resultados obtener los genes alterados y mediante Wikipathways las vías de señalización afectadas por la inhibición de *Zmiz1*.

CAPITULO IX

RESULTADOS

9.1 PCR punto final y tiempo real

Se realizó una PCR *in silico* (figura 3), utilizando el programa Primer-Blast para asegurarnos de obtener el resultado esperado con los primers utilizados, a partir de la secuencia del ARN mensejaero de *ZMIZ1* de rata (NM_001108393.1) posteriormente, se procedió primero a extraer el ARN de cualquiera de los dos hemisferios de embrión, recién nacido y adulto (se realizaron triplicados biológicos de embriones, recién nacidos y adultos), y a partir de la retrotranscripción (figura 4) se obtuvo el ADN , el cual se sometió a una PCR punto final (figura 5), obteniéndose un fragmento de 98 pares de bases.



	Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CTCAACTCCATGAGCTCCAT	Plus	20	965	984	57.00	50.00	6.00	6.00
Reverse primer	GGAGGCTGATTGGTGTCTG	Minus	20	1062	1043	58.54	55.00	3.00	1.00
Product length	98								

Figura 3. PCR *in silico* de *ZMIZ1*. En la imagen se observan las características de los primers utilizados y la longitud del producto amplificado que es de 98 pb.

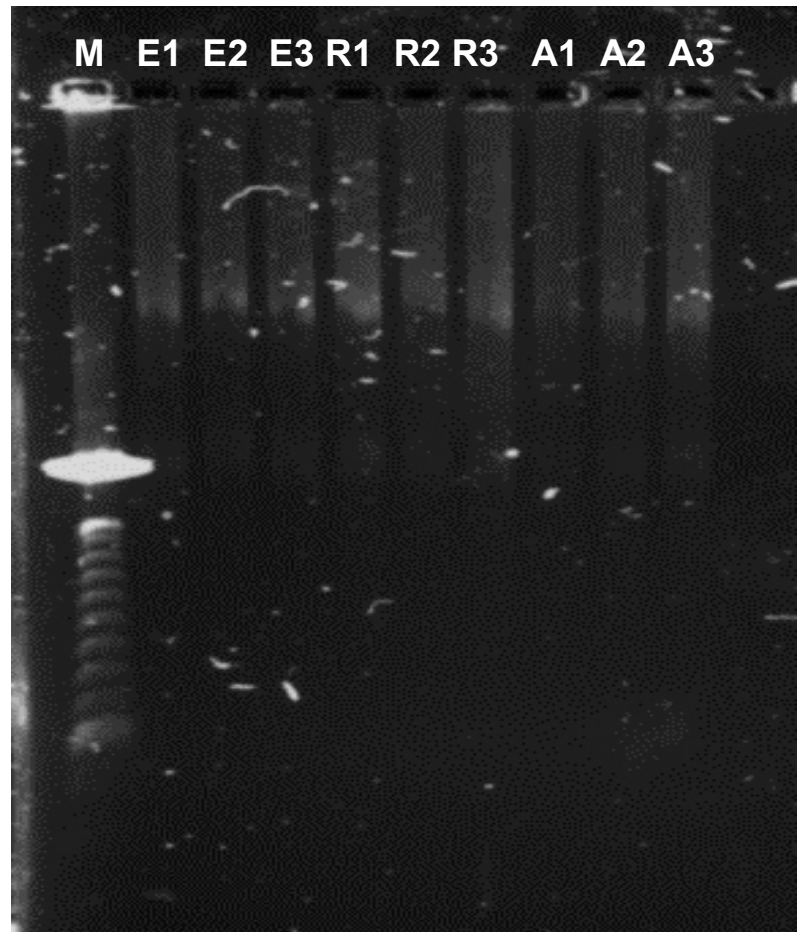
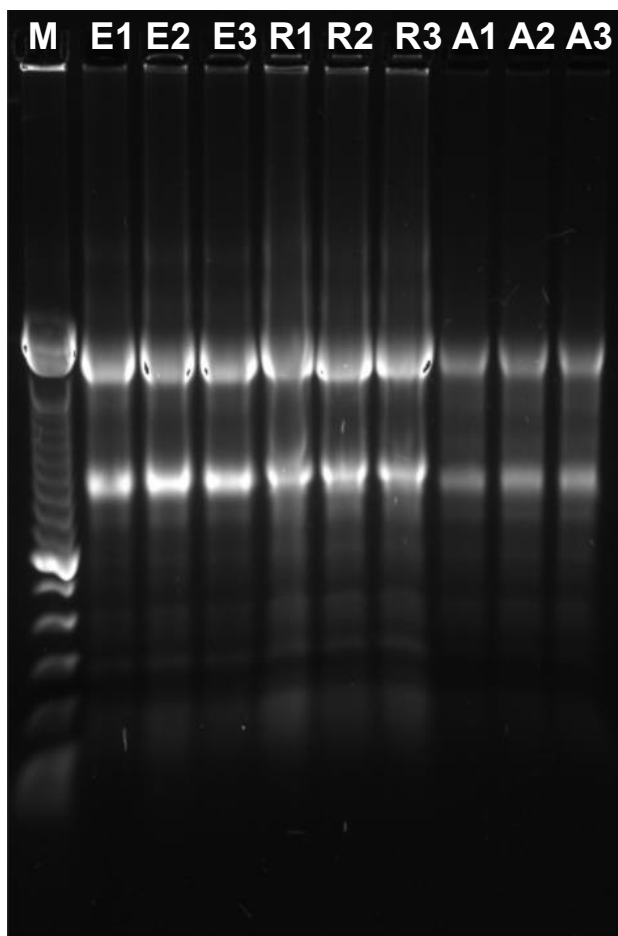


Figura 4. Geles de la extracción de ARN y retrotranscripción de las diferentes etapas de desarrollo de cerebro de rata. En el lado izquierdo se muestra la extracción de ARN (las bandas que se observan con intensidad, son las subunidades ribosomales), a partir de los hemisferios de las diferentes etapas de desarrollo de rata. Mientras que en el lado derecho se observa el ADN complementario (indicado por un barrido debido al uso de random primers, que va desde los 353pb-12.3kb), tras someter el ARN a una retrotranscripción. (M= Marcador de peso molecular; E1, E2 y E3 = embrión 1, embrión 2 y embrión 3, respectivamente; R1, R2, y R3 recién nacido 1, recién nacido 2 y recién nacido 3, respectivamente; A1, A2, A3 = adulto 1, adulto 2 y adulto 3, respectivamente).

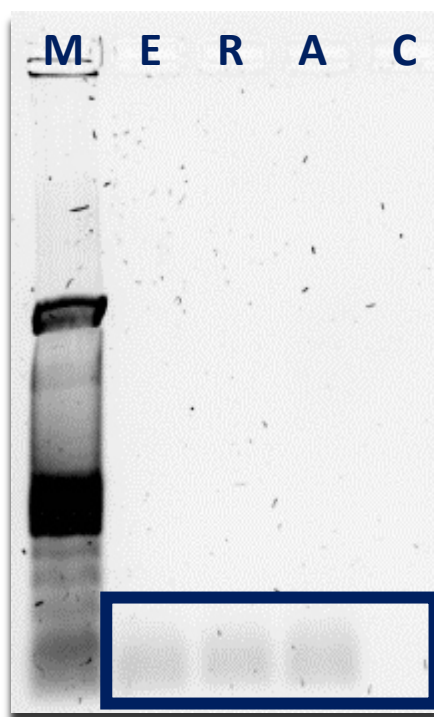


Figura 5.- PCR punto final de *ZMIZ1*. Amplificación del producto esperado con un peso 98 pb (recuadro azul), mediante PCR punto final. (M= Marcador de peso molecular; E= embrión, R = recién nacido, A = adulto y C= control negativo).

Una vez comprobada la correcta amplificación de nuestro producto deseado, se procedió a realizar la PCR tiempo real (figura 7). A partir de la muestra de recién nacido a diferentes concentraciones (1000, 200, 40 y 8ng) obteniéndose un gráfico de amplificación y una curva de fusión, en la cual no se observa ninguna inespecificidad (*GAPDH* y *ZMIZ1*). Se utilizaron los Cts, del gráfico de

amplificación para realizar una curva de calibración y determinar la eficiencia tanto de los primers para *GAPDH* como para *ZMIZ1*, a través de la fórmula $10^{(-1/\text{pendiente})}$.

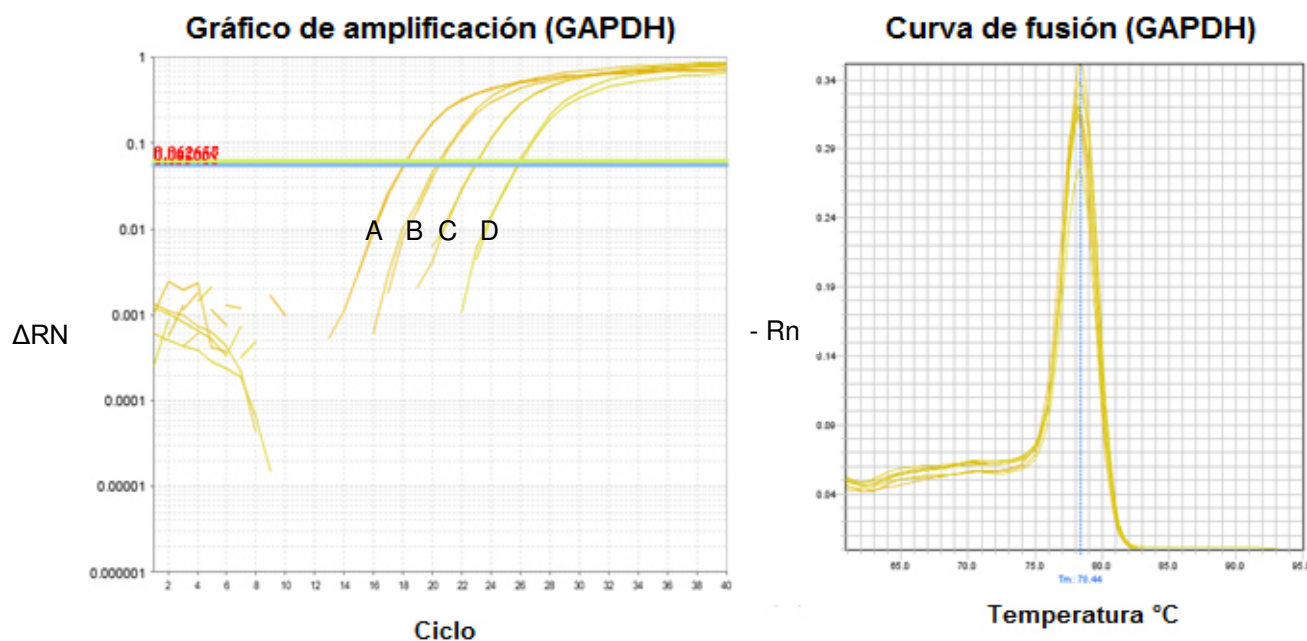


Figura 6.- Gráfico de amplificación y de fusión de *GAPDH* utilizando diferentes concentraciones. Al lado izquierdo se muestra el gráfico de amplificación (A=1000, B=200, C=40 y D=8ng) y al lado derecho la curva de fusión para *GAPDH*.

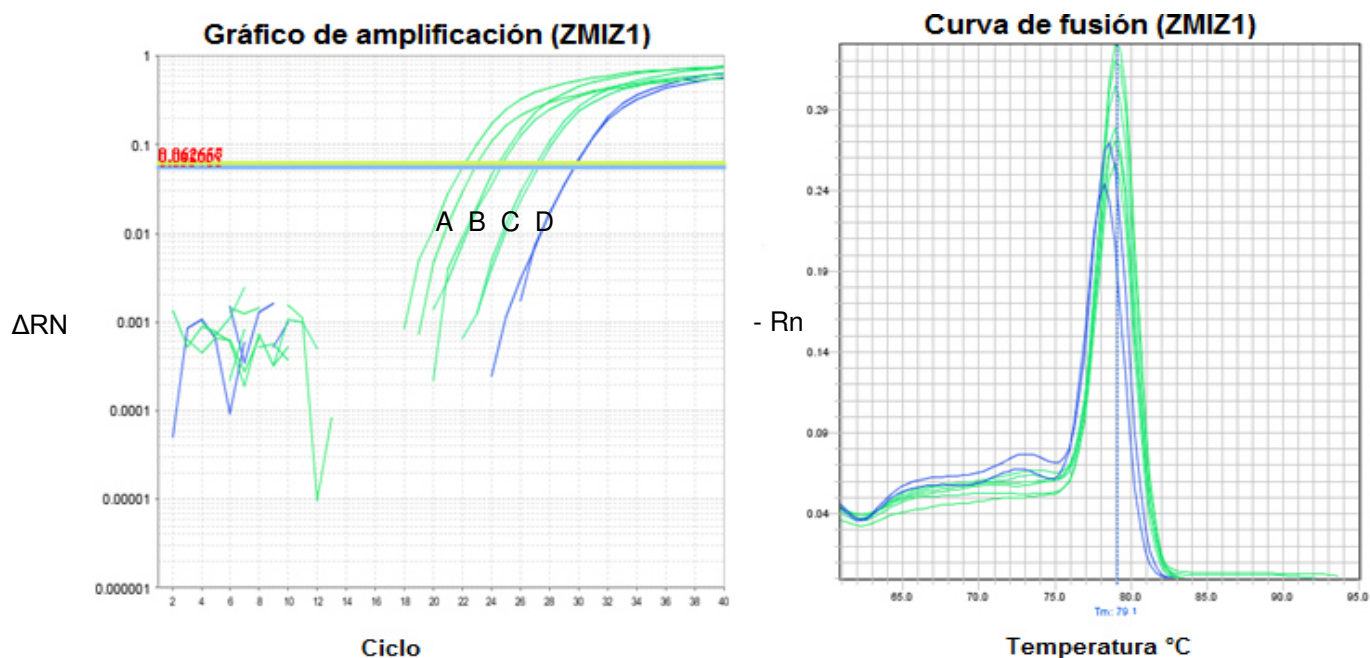


Figura 7.- Gráfico de amplificación y de fusión de *ZMIZ1* utilizando diferentes concentraciones. Al lado izquierdo se muestra el gráfico de amplificación (A=1000, B=200, C=40 y D=8ng) y al lado derecho la curva de fusión para *ZMIZ1*.

Después de determinar la eficiencia de los primers, se procedió a analizar la expresión relativa de *GAPDH* y *ZMIZ1*, utilizando una concentración de 200ng para poder discernir diferencias entre embrión, recién nacido y adulto.

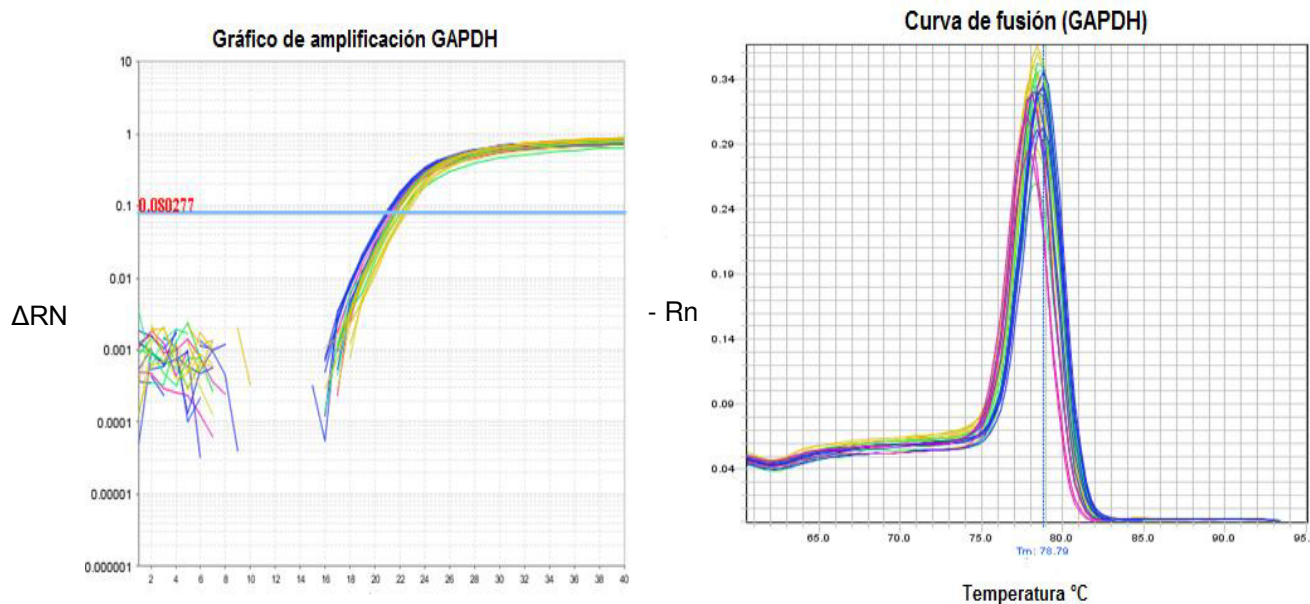


Figura 8.- Gráfico de amplificación y curva de fusión de *GAPDH*, para determinar la expresión relativa. Al lado izquierdo se muestra el gráfico de expresión relativa y al lado derecho la curva de fusión para *GAPDH*.

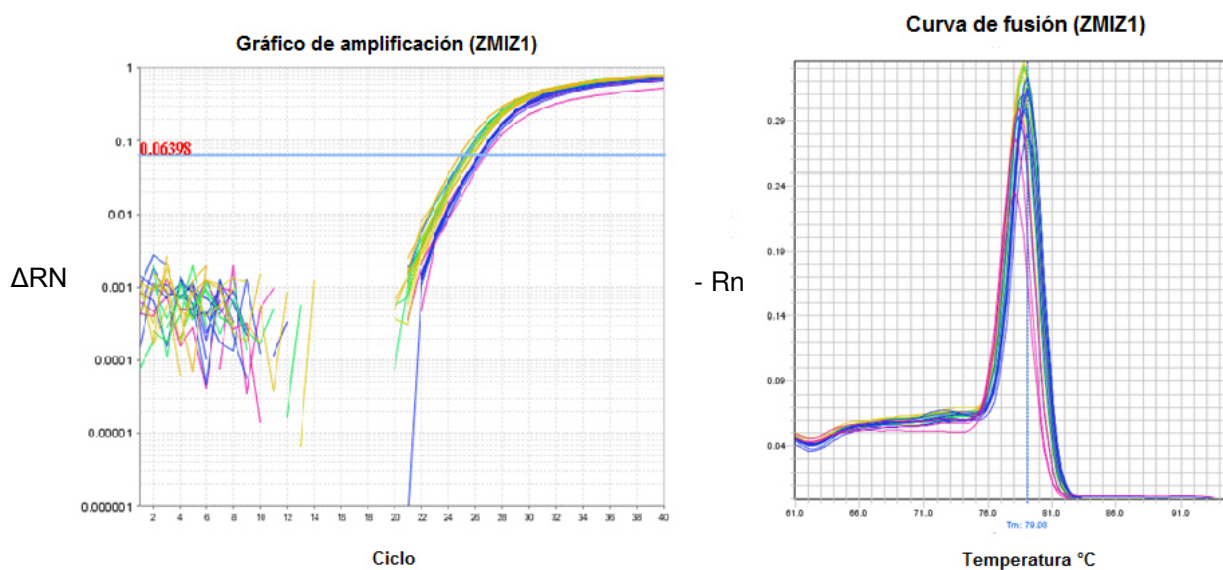


Figura 9.- Gráfico de amplificación y curva de fusión de *ZMIZ1*, para determinar la expresión relativa. Al lado izquierdo se muestra el gráfico de expresión relativa y al lado derecho la curva de fusión para *ZMIZ1*.

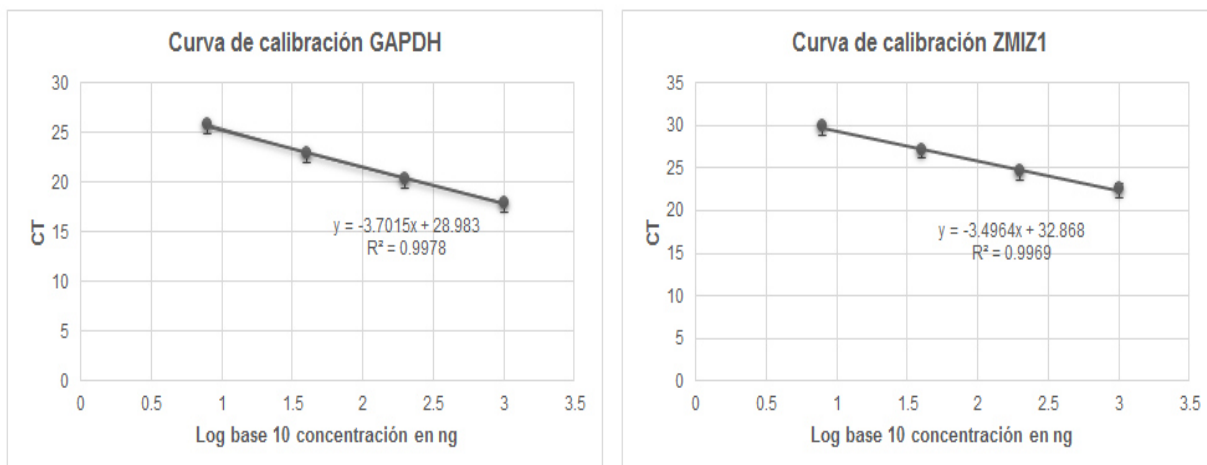


Figura 10.- Curvas de calibración de *GAPDH* y *ZMIZ1*. Al lado izquierdo se muestra la curva de calibración para *GAPDH* y en el lado derecho la curva de calibración para *ZMIZ1*.

A partir de los Cts se calculó la expresión relativa y se procedió a realizar un gráfico utilizando el programa GraphPad Prism 7.01, dando como resultado una diferencia significativa en la expresión de *ZMIZ1* entre las diferentes etapas del desarrollo de cerebro de rata (Figura 11).

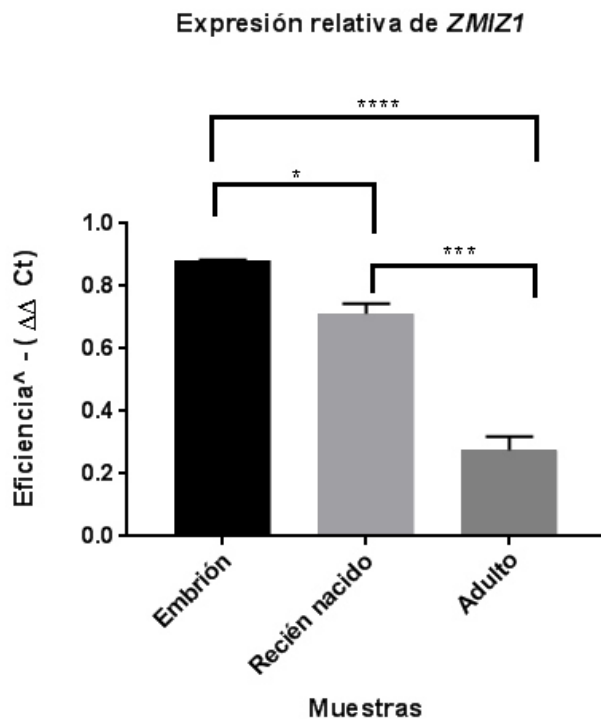


Figura 11.-Expresión relativa de *ZMIZ1* en diferentes etapas de desarrollo de cerebro de rata. (**** Y *** = Extremadamente significativo, ** = Muy significativo, * = Significativo).

9.2 Inhibición

También se determinó la expresión relativa de *ZMIZ1* en células de glioblastoma C6, para posteriormente realizar la inhibición de *ZMIZ1* utilizando el ARNi s166829, que reconoce las diferentes isoformas de este gen. La expresión de *ZMIZ1* en la línea celular es muy semejante a la de adulto, además no se observa una diferencia significativa al comparar estos dos grupos (figura 12).

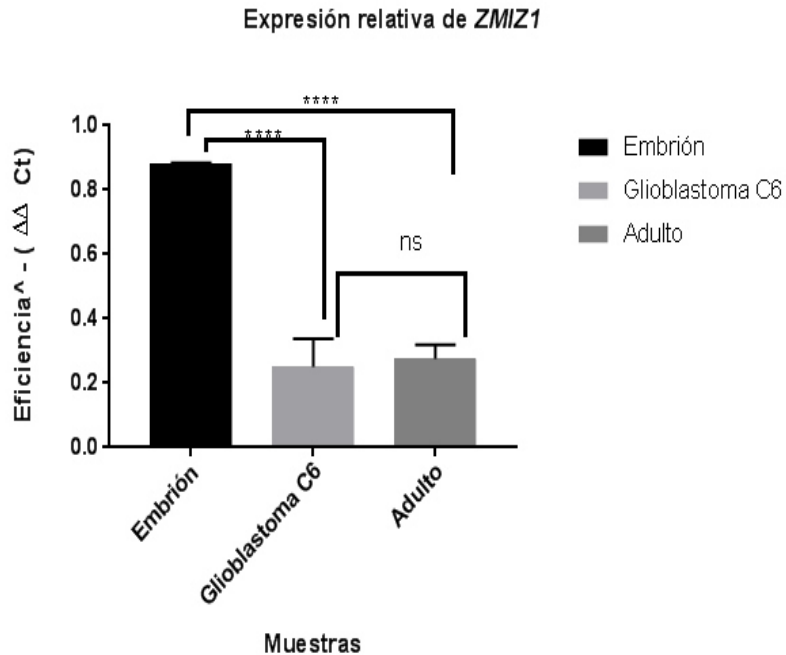


Figura 12.- Expresión relativa de *ZMIZ1* en las células de glioblastoma C6 de rata (** = Extremadamente significativo, ns = no significativo).**

Para realizar la inhibición, primero se cultivaron las células bajo las condiciones descritas en la metodología y cuando se obtuvo un 90% de confluencia se realizó conteo celular y a partir de 40,000 células se procedió a realizar la inhibición, estas células se cultivaron con el agente lipofectante (siPORT NeoFX) y el ARNi por 24, 48 y 72 horas y no se observaron cambios en la morfología de la línea tras la inhibición de *ZMIZ1* (figura 13) .

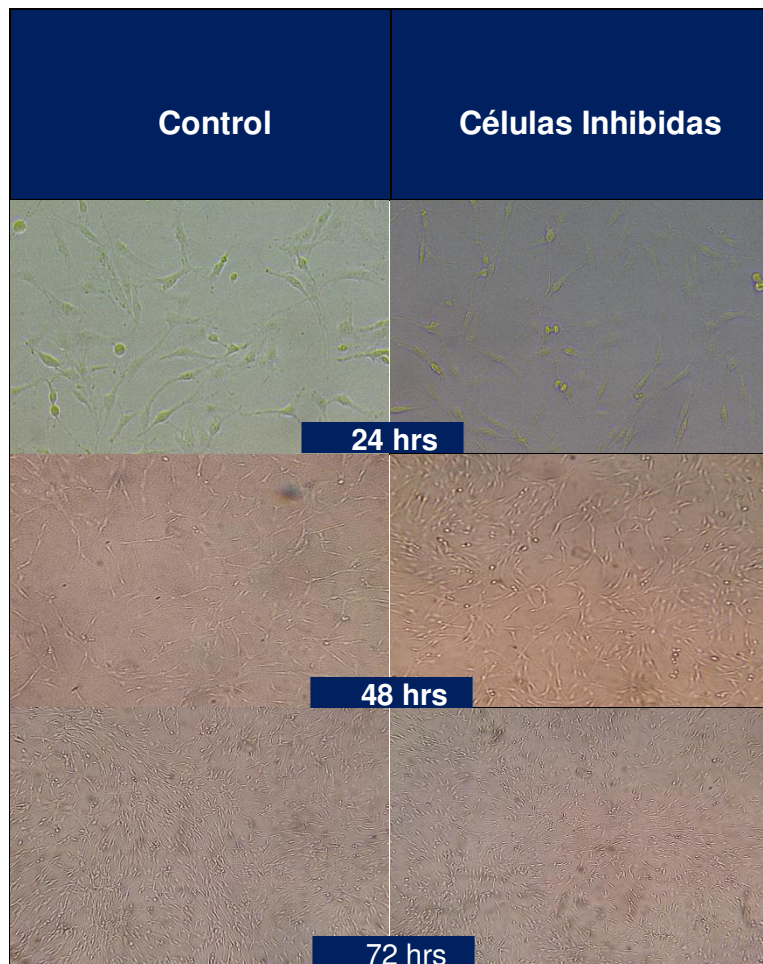


Figura 13.- Células control e inhibidas (ARNi contra ZMIZ1), con diferentes tiempos de incubación (24, 48 y 72 horas).

Tras los períodos de incubación, se procedió a extraer el ARN y convertirlo a ADNc (figura 14) para analizar la expresión relativa, y determinar el tiempo al cual se obtenía un mayor porcentaje de inhibición. Siendo a las 48 horas, el período de incubación con el mayor porcentaje, el cual correspondió a un 55% de inhibición

(figura 17), pero antes de realizar la PCR tiempo real se realizó una PCR punto final (figura 15), solo para verificar la obtención del producto deseado.

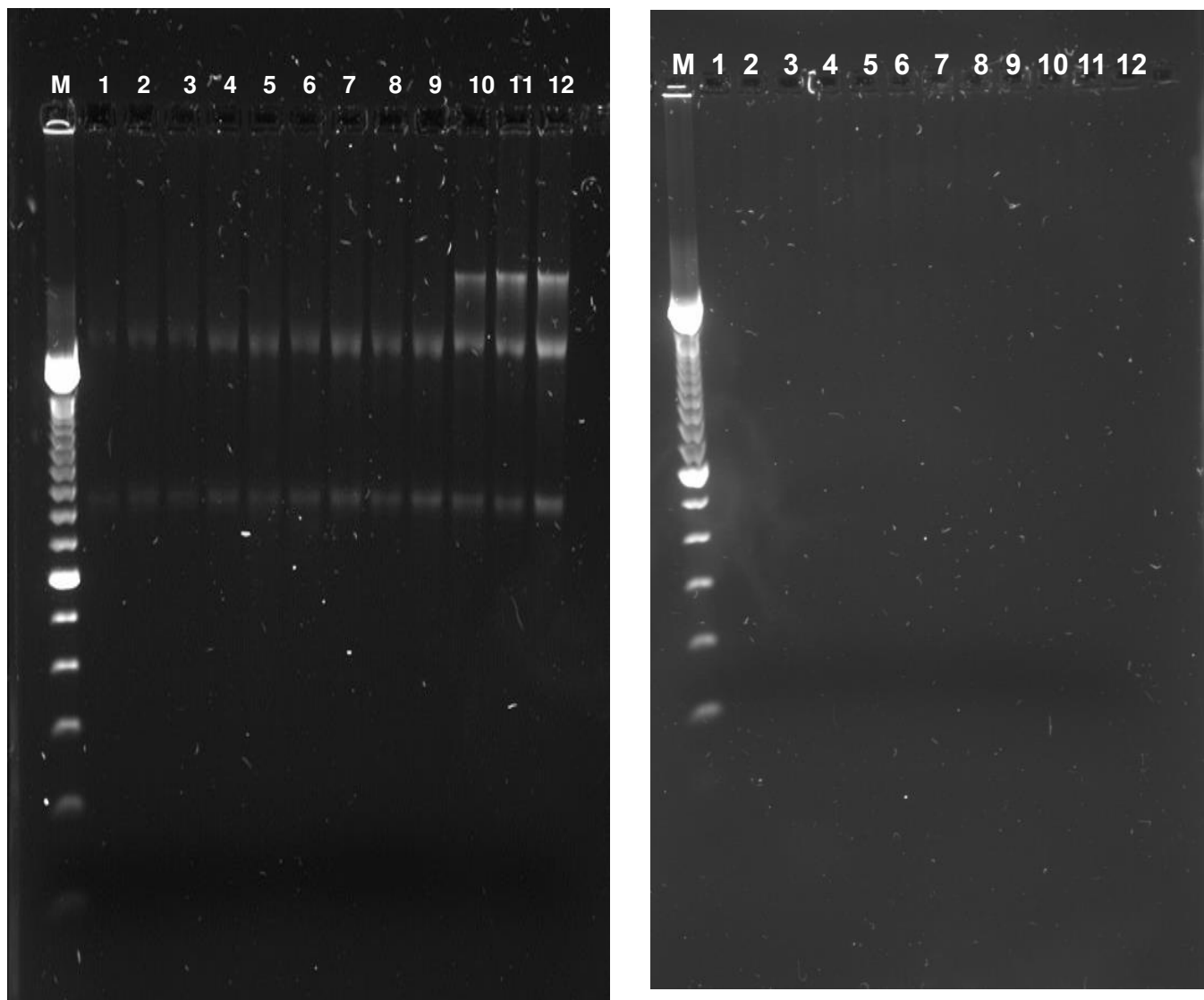


Figura 14. Geles de la extracción y retrotranscripción, tras la inhibición de *ZMIZ1*. En el lado izquierdo se muestra la extracción de ARN (las bandas intensas corresponden a las subunidades ribosomales y en los carriles 10, 11 y 12 se observan estas subunidades y además, ADN genómico), de los controles (ARNi scrambled no interfiere la expresión de ningún ARN mensajero), así como las células inhibidas a diferentes tiempos de incubación. Mientras que en el lado derecho se observa el ADN complementario (barrido que va 353 pb-12.3 kbs), tras someter el ARN a una

retrotranscripción. (M= Marcador de peso molecular, 1,2 y 3 = Controles; 4,5 y 6 inhibición de *ZMIZ1* con un tiempo de incubación de 24 horas; 7,8 y 9 = inhibición de *ZMIZ1* con un tiempo de incubación de 48 horas; 10,11 y 12= inhibición de *ZMIZ1* con un tiempo de incubación de 72 horas).



Figura 15.- PCR punto final, tras la inhibición de *ZMIZ1*, a diferentes períodos de incubación.

Se observa el producto amplificado de 98 pb (recuadro azul), tras la inhibición de *ZMIZ1* a diferentes períodos de tiempo de incubación (M= marcador de peso molecular, 1= inhibición de *ZMIZ1* con un tiempo de incubación de 24 horas, 2= inhibición de *ZMIZ1* con un tiempo de incubación de 48 horas y 3= inhibición de *ZMIZ1*

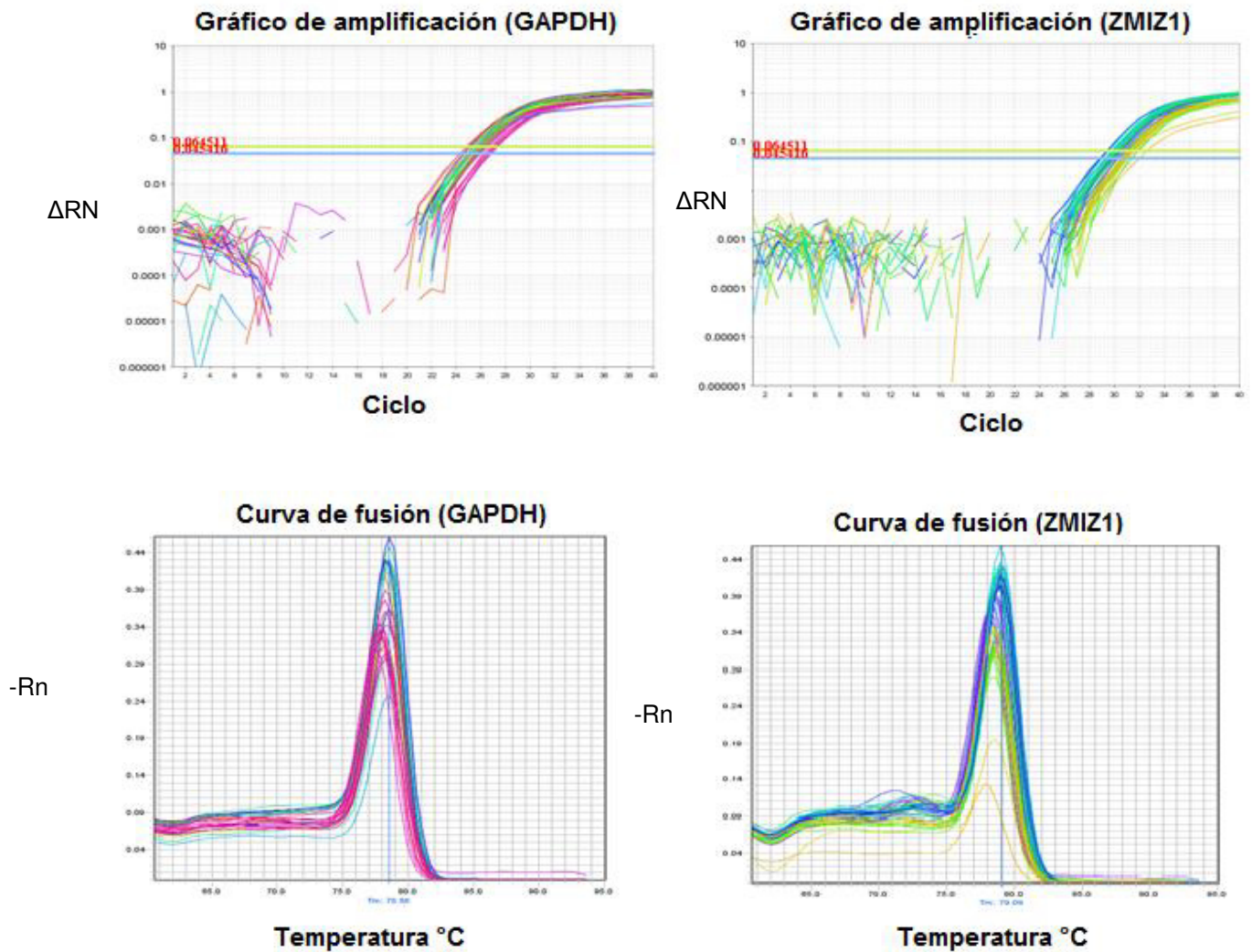


Figura 16.- Gráficos de amplificación y curvas de fusión de *GAPDH* y *ZMIZ1*, tras la iniciación de *ZMIZ1* a diferentes períodos de incubación (24, 48 y 72 horas). Al lado izquierdo se observa el gráfico de amplificación y la curva de fusión para *GAPDH*. Mientras que en el lado derecho se encuentra el gráfico de amplificación y la curva de fusión para *ZMIZ1*.

Inhibición de *ZMIZ1* en células de glioblastoma C6

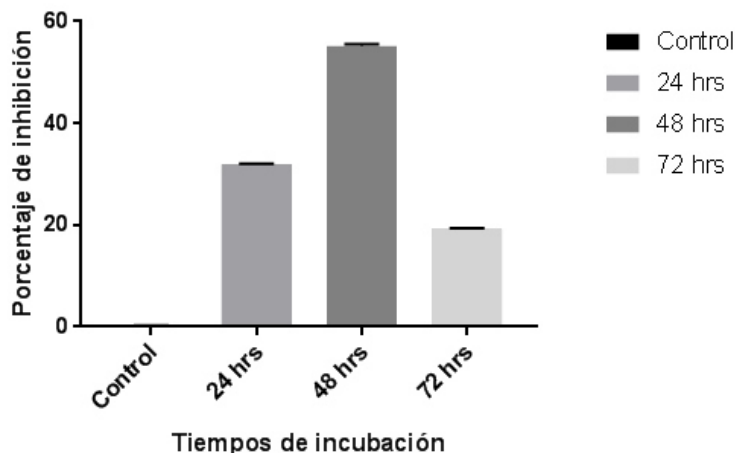


Figura 17.- Porcentajes de inhibición de *ZMIZ1*, tras su incubación a diferentes períodos de tiempo (24, 48 y 72 horas).

9.3 Microarreglo de Expresión

Una vez determinado el porcentaje al cual se obtenía una mayor inhibición (48 horas) de *ZMIZ1*, se procedió a realizar el microarreglo de expresión, para determinar los cambios en el transcriptoma de la línea celular de glioblastoma C6, y así identificar los genes potencialmente regulados por *ZMIZ1*. Para el microarreglo se utilizaron 8 muestras, de las cuales dos eran duplicados de las células sometidas a la inhibición de *ZMIZ1* con un periodo de incubación de 48 horas, mientras que el resto eran triplicados del control de células incubadas con el ARNi scrambled y una muestra control sin agente lipofectante (figura 18). Las muestras fueron hibridadas en el chip de expresión de rata, para posteriormente ser escaneadas y a través del software Agilent Feature Extraction determinar si cumplían con los controles de calidad. Casi todas las muestras cumplieron con los controles de calidad, excepto la muestra control sin ARNi scrambled, la cual

mostró una pobre hibridación con las sondas del chip y fue por ello que se eliminó para ser procesada por el software GeneSpring v14.5. Con GeneSpring v14.5 se realizó el análisis estadístico para determinar aquellos genes que estaban diferencialmente expresados, para ello se realizó un análisis de T de Student (significancia menor o igual 0.01), y se tomaron en cuenta aquellas entidades cuyo cambio de expresión fue al menos de 2 veces y a través de WikiPathways se determinaron las vías en las que estaba involucrados estos genes diferencialmente expresados.

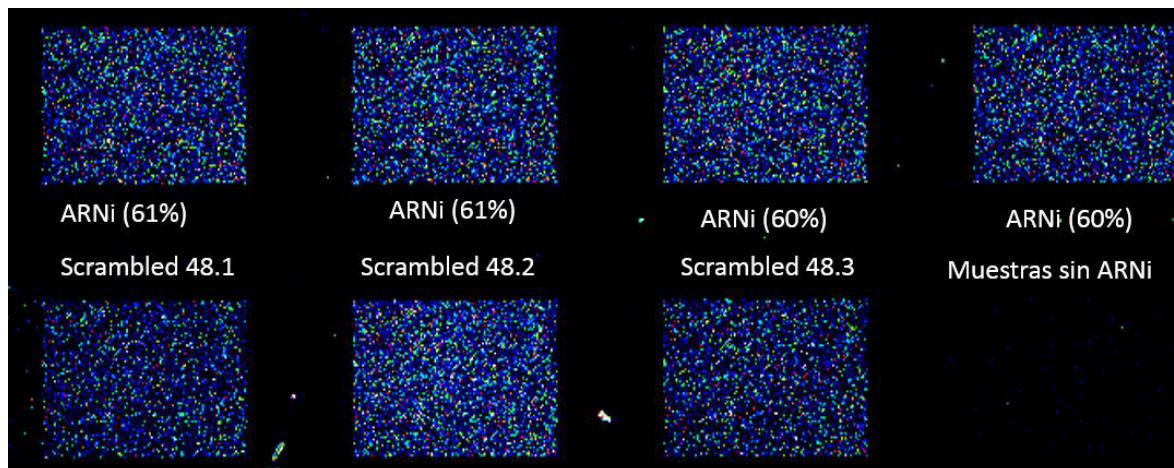


Figura 18.- Imagen del microarreglo de expresión, posterior a la hibridación de las muestras.

Cada punto representa la hibridación de las muestras con las sondas del chip.

El análisis de GeneSpring v14.5 arrojó que había 27 entidades (sondas de genes) sub-expresadas, de las cuales corresponden a 21 genes (figura 19). Entre las rutas en las que participan estos genes, se encuentran las vías de señalización de los receptores del factor de crecimiento epidermal (ErbB y EGFR), de la insulina, de la metilación, de las monoaminas y en la vía de señalización del metabolismo del carbono. Además, se determinó la correlación entre las muestras, ya sean controles o muestras con el ARNi contra *ZMIZ1* (figura 19), observándose una alta

correlación entre las muestras inhibidas (solo uno de los duplicados muestra una pobre correlación); lo mismo se observó en los controles al compararse entre ellos, mostrando una alta correlación, mientras que al hacer una comparación entre alguna muestra inhibida y algún control se observa una pobre correlación.

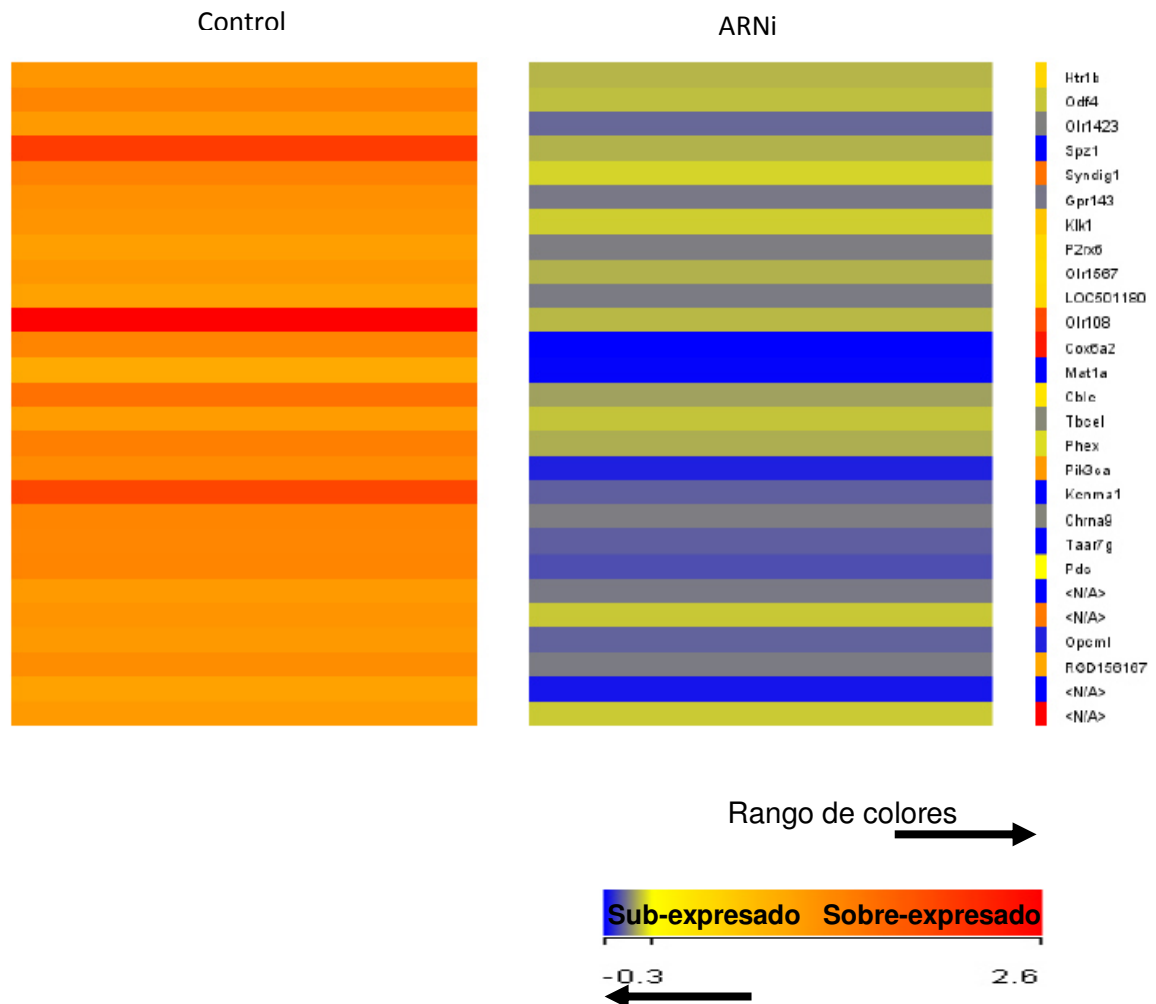


Figura 19.- Mapa de calor, tras la inhibición de ZMIZ1. En esta imagen se compara la expresión de los genes diferencialmente expresados (que cumplieron con una P menor o igual a 0.01, tras la

prueba t de student). Solo se observan genes sub-expresados tras la inhibición de *ZMIZ1* con respecto al control.

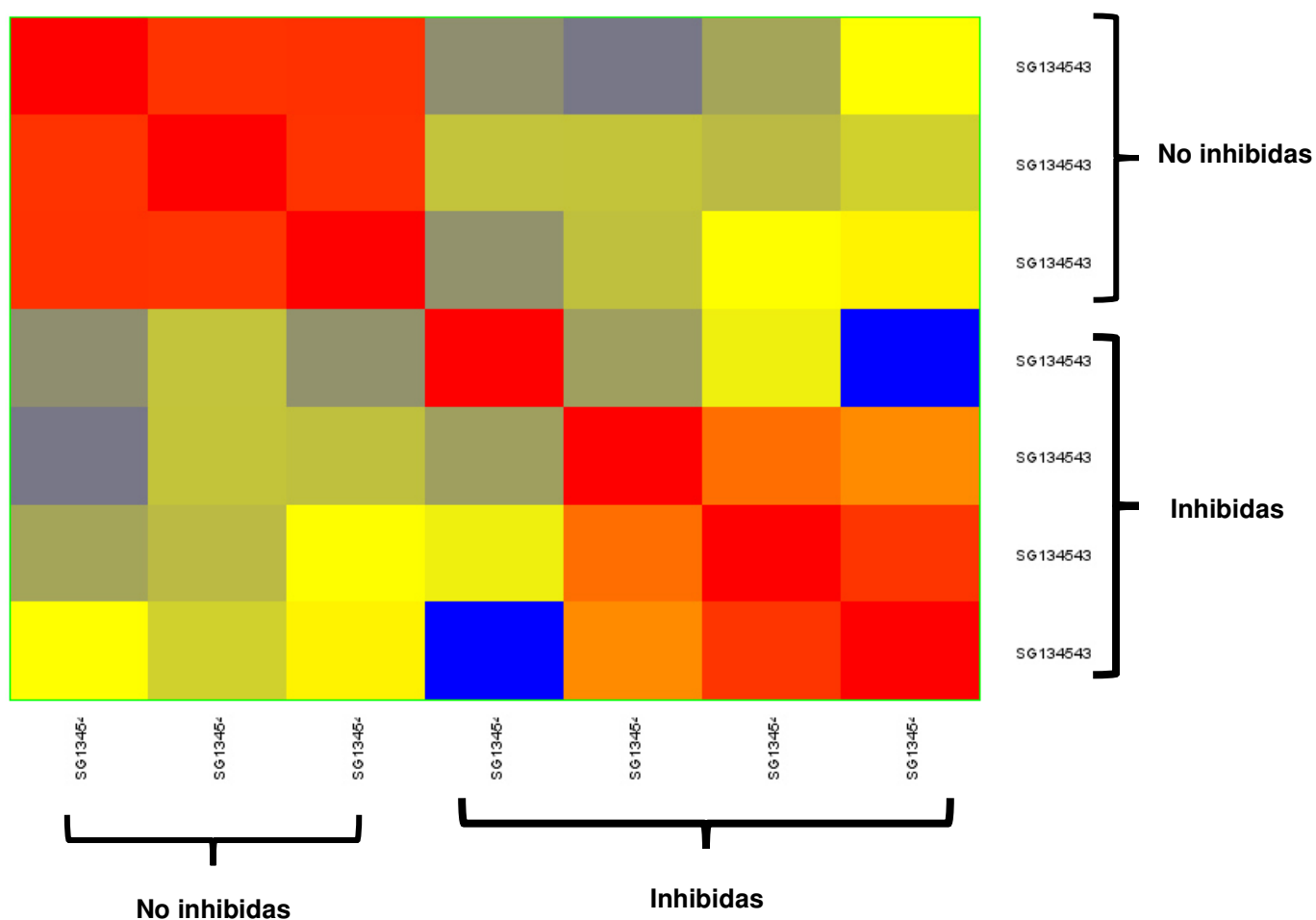


Figura 20.- Correlación entre las muestras inhibidas y no inhibidas. En esta imagen se observa una alta correlación entre las muestras inhibidas y no inhibidas, respectivamente (rojo = alta correlación y azul= baja correlación).

CAPITULO X

DISCUSIÓN

El desarrollo del sistema nervioso central (SNC) es un proceso compuesto de una serie de modificaciones y una compleja expresión de genes espacio-temporal. Aunado a esto, la complejidad anatómica en mamíferos hace que se presenten problemas para el análisis de la función y expresión de los genes. El reto más difícil es el hecho de que hay cientos de tipos de linajes celulares funcionalmente y morfológicamente definidos. Lo que da como resultado que la interpretación de los fenotipos causados por anomalías en el SNC, sea en ocasiones muy difícil de asociar a patologías neurológicas provocadas por la alteración de un gen o grupo de genes. Este problema se deriva de la inter-dependencia de los tipos de células neuronales y la liberación de factores tróficos producidos por otros tipos de células. Por ejemplo, la muerte de neuronas aferentes, en algunas ocasiones se acompaña de inactivación celular o muerte de clases específicas de neuronas, que son directamente afectadas por la mutación. Por lo tanto, frecuentemente la base celular para el fenotipo del SNC, no puede ser evaluada sin el uso de quimeras de embriones experimentales que presenten genes mutados o al menos información precisa sobre los patrones de expresión del gen mutado (Heintz, 2000).

A razón de lo anterior, en este trabajo se optó por utilizar la línea celular de glioblastoma C6 de rata, ya que las células gliales, la conforman tres tipos fundamentales de células en el sistema nervioso central: astrocitos,

oligodendrocitos y células endoteliales. La astroglia constituye uno de los tipos de glía que guarda una relación más directa con la plasticidad neural. La plasticidad sináptica, representa la posibilidad de modificación del tipo, forma, número y función de la sinapsis y de los circuitos neuronales, interviniendo en procesos tan diversos como el aprendizaje y la memoria, la respuesta a distintas situaciones fisiológicas y la recuperación después de sufrir lesiones (Bustamante *et al.*, 2004). Además, se sabe que la glía interviene activamente en el proceso de renovación sináptica, permitiéndole al sistema nervioso central realizar modificaciones anatómicas y funcionales, a lo largo del curso entero de toda la vida del organismo (Nieto *et al.*, 2003).

En la actualidad, se tiene un limitado conocimiento sobre los genes y la función de genes involucrados en procesos biológicos en SNC. Por lo tanto, es de vital importancia el descubrimiento de nuevos genes y su función en el SNC. Esto nos permitirá relacionar el origen de diferentes patologías neurológicas descubiertas y aún por descubrir. Tal es el caso de *ZMIZ1*, del cual no se tiene claro su papel en el SNC, y como ya se mencionó en la introducción, este gen se encontró truncado y fusionado con otro gen debido a una translocación equilibrada *de novo* entre los cromosomas 10 y 19, en una niña de 11 años con DI (edad mental de 5 años) y múltiples alteraciones neuropsiquiátricas (una pobre orientación en el espacio, falta de atención y contacto visual, impulsividad sexual y falta de interacción social) (Córdova-Fletes *et al.*, 2015).

Por todo lo anterior, se procedió a analizar los niveles de expresión de *ZMIZ1* en diferentes etapas de desarrollo en rata. Además, se realizó un estudio *in vitro*, en

el cual se inhibió la expresión de *ZMIZ1*, para determinar las vías reguladas por este gen y las posibles funciones en las que está involucrado.

De acuerdo con nuestros resultados de expresión, *ZMIZ1* mostró una alta expresión en las diferentes etapas de desarrollo de cerebro de rata (embrión de 15 días, recién nacido de 1 día y adulto de 3-5 meses), habiendo un declive a partir de la etapa de recién nacido y adulto con respecto al embrión. Esto concuerda con lo reportado por Rodríguez-Magadán y cols., (2008), quienes observaron que en tejido neural de embriones de ratón, hay una alta expresión de dicho gen, durante el desarrollo embrionario. Por lo tanto y en concordancia con estos autores *Zmiz1*, puede tener un papel importante en el neurodesarrollo embrionario, pero al mismo tiempo tener participación en otros procesos de mantenimiento/comunicación neuronal.

Además, *ZMIZ1* interactúa con los complejos de remodelación de la cromatina SWI/SNF, los cuales juegan un papel importante en distintos procesos, tales como, transcripción, diferenciación celular y reparación del ADN, en diferentes tipos celulares, incluyendo neuronas. Este complejo también se ha visto implicado en DI. En este sentido, Tsurusaki y cols., (2012) identificaron que mutaciones en los genes *AR1D1B*, *ARID1A*, *SMARCA4* (BRG1), *SMARCE1* y *SMARCB1*, causan el síndrome de Coffin-siris. Este síndrome se caracteriza por una severa DI, retraso en el habla, así como hipertriosis y ausencia de la quinta uña o uña de los pies. Interesantemente, Córdova-Fletes y cols., (2015) reportaron por primera vez la interacción entre las proteínas *ZMIZ1* y BRG1 (*SMARCA4*) en células de cerebro de ratón. Además, observaron que la paciente en la cual encontraron

truncado la proteína *ZMIZ1*, presentaba ciertas características que se sobrelapan con el Síndrome de Coffin-Siris, sugiriendo que la haploinsuficiencia de *ZMIZ1*, podría conducir a una interacción deficiente entre *ZMIZ1* y *BRG1* y afectar por lo tanto, la expresión de genes blanco durante el neurodesarrollo; de hecho, al ser un co-factor de remodelación de la cromatina, *ZMIZ1*, podría actuar como un regulador transcripcional también en células del cerebro. Si bien, existen algunos reportes que indican una posible asociación de las variantes genéticas de *ZMIZ1* en ciertas alteraciones psiquiátricas, aún no hay casos reportados hasta la fecha, que indiquen que una delección o la haploinsuficiencia de *ZMIZ1*, causen DI y/o alteraciones neurosiquiátricas. Por lo tanto, el presente trabajo, muestra los primeros indicios de las consecuencias de la haploinsuficiencia de *ZMIZ1* en células nerviosas.

Puesto que los porcentajes de inhibición de *ZMIZ1* en nuestro estudio fueron alrededor de 60%, es posible que nuestro modelo asemeje o simule la haploinsuficiencia de *ZMIZ1* (los ratones homocigotos para una mutación que produce una proteína trunca o incompleta de *ZMIZ1* son incompatibles con la vida, Beliakoff et al., 2008). Interesantemente, los resultados del análisis del transcriptoma de las células de rata tras la inhibición selectiva de *ZMIZ1*, mostró sólo genes sub-expresados, sugiriendo que *ZMIZ1* activa la transcripción de estos genes y por ende, permite su expresión. Algunos de estos genes pertenecen a la familia de los receptores acoplados a las proteínas G (GPCR, del inglés G protein-coupled receptors), los cuales son activados por un gran número de ligandos, incluyendo fotones, complejos aromáticos, neurotransmisores y hormonas.

Muchos de los receptores de la familia 1 de los GPCR'S se distribuyen ampliamente en el SNC y están involucrados en la regulación del control motor, aprendizaje y memoria.

Entre los genes afectados tras la inhibición de *ZMIZ1*, que pertenecen a la familia 1 de los GPCRS, se encontró a *HTR1B* y *TAAR7G*. *HTRB1* se encarga de regular el sistema de serotonina (vía de las monoaminas), involucrándose en las vías de la motivación y la memoria (Drago *et al.*, 2010). Estas funciones concuerdan con las de los receptores del neurotransmisor de serotonina de la familia 1 de los GPCRS, ya que *HTRB1* pertenece a esta familia. Entre las funciones de este tipo de receptores se incluyen, sueño, alimentación, agresión y termorregulación. Además, *HTR1B* se ha relacionado con el trastorno límite de la personalidad o borderline (Tadic, *et al.*, 2009). Este es un complejo desorden psiquiátrico, caracterizado por un comportamiento impulsivo, de autoagresión y suicida, esto se asemeja a las características observadas cuando hay un desequilibrio en el sistema serotoninérgico (Karasinska, *et al.*, 2003). Por otra parte *TAAR7G* es un neuromodulador de la vía de las aminas y al igual que *HTRB1* está involucrado en desórdenes psiquiátricos, además, de ser responsable de causar depresión y migraña (Linemann *et al.*, 2005). Llamativamente, esta constelación de rasgos clínicos es consistente con las alteraciones observadas en la paciente con la proteína truncada de *ZMIZ1* (Córdova-Fletes *et al.*, 2015).

Otros genes que también se ven afectados por la inhibición de *ZMIZ1* y que pertenecen a la familia de los GPCRS son *GPR143* y *PDC*. *GPR143* funciona como receptor para DOPA en células epiteliales de retina

(López *et al.*, 2008). Mutaciones en este receptor, causan albinismo ocular de tipo 1. Esta enfermedad está ligada al cromosoma X y se caracteriza por una severa reducción visual, hipopigmentación de la retina, hipoplasia de la fovea y la presencia de melanosomas gigantes en los melanocitos de la piel y en el pigmento epitelial de la retina (O'Donnell *et al.*, 1976; Garner y Jay, 1980). Este receptor también se ubica en el núcleo del tracto solitario en el bulbo raquídeo, en donde está involucrado en la regulación de la respuesta a bradicardia y a depresores, a través de su unión a DOPA, mediando así la respuesta a DOPA en el SNC (Hiroshima *et al.*, 2013). Por otro lado, a *PDC* también se le ha visto involucrado en la regulación de la fototransducción visual, modulando la actividad de las subunidades $\beta\gamma$ de la proteína G. Alteraciones en *PDC* se han visto relacionadas con aberraciones en la morfología de la retina (Sokolov *et al.*, 2004). Además, *PDC* juega un importante papel en la regulación de la presión arterial, aunque aún no está del todo claro el mecanismo por el cual se lleva a cabo. Se sabe que *PDC* regula la actividad eléctrica debido a cambios específicos en la conductividad de potasio y al aumentar la concentración de potasio se incrementa la actividad eléctrica simpática, dando lugar al desarrollo de hipertensión. Este gen es expresado en los ganglios simpáticos del sistema periférico y juega un papel importante en los receptores adrenérgicos, ya sea induciendo estrés o hipertensión (Beetz, 2009).

Tras la inhibición de *ZMIZ1*, también se vieron perjudicados, aquellos genes que participan en vías que son activadas tras un trauma cerebral (Eng *et al.*, 1987; Norenberg, 1994; Fawcett *et al.*, 1999; Eng *et al.*, 2000; McGraw *et al.*, 2001;

Sofroniew, 2009; Zhou *et al.*, 2015), enfermedades neurodegenerativas o cáncer (Borgoño y Diammandis, 2004; Broderick *et al.*, 2004; Adinolfi *et al.*, 2015). Aunque el cáncer y la neurodegeneración son a menudo considerados como mecanismos opuestos, uno debido a que potencia la resistencia a la muerte celular y otro por ocasionar una muerte celular prematura, respectivamente. Muchos de los genes asociados con cualquier cáncer o neurodegeneración, juegan un papel importante en el control del ciclo celular, reparación del ADN y en la señalización de las cinasas (Plun *et al.*, 2010), como tal es el caso de KLK1, P2RX6 y PIK3Ca, los cuales están implicados en la regulación de ciclo celular, mediante la activación de AKT.

KLK1 es una proteasa (KLK1) que activa los receptores PARS (receptores activados por proteasas) y los receptores de bradiquinina (B2), los cuales pertenecen a la familia de los receptores GPCRS (Ossovskaya y Bunnett 2004; Bhoola *et al.*, 2001). A través de estos receptores, regula vías que participan en la descamación de la piel, formación del esmalte de los dientes, plasticidad sináptica neuronal y en la función del riñón y el cerebro (Stefanini *et al.*, 2015). Además, se sabe que KLK1 en neuronas promueve una rápida retracción de las neuritas y degeneración de las neuronas corticales *in vitro* y cuando esta proteasa está sobre-expresada suprime la fosforilación de AKT comprometiendo la supervivencia celular (Scarisbrick *et al.*, 2008). También KLK1 en neuronas activa a ERK desencadenando diversos efectos como: muerte neuronal, nocicepción y plasticidad neuronal (Selcher *et al.*, 2003). En contraste a lo observado en células gliales, ya que se activa AKT (Choi *et al.*, 2005; Neary *et al.*, 2005) y ERK,

promoviendo la diferenciación de estas células y la astrogliosis (Wang *et al.*, 2002; Sorensen *et al.*, 2003; Nicole *et al.*, 2005; Luo *et al.* 2006; Wang *et al.*, 2007). Esto concuerda con lo observado tras un accidente cerebro vascular, en donde KLK1 cambia la expresión molecular y morfología de los astrocitos provocando la formación de cicatrices y la inhibición de la regeneración de los axones (Fawcett *et al.*, 1999; McGraw *et al.*, 2001; Sofroniew, 2009) y además, desencadena hemorragia cerebral, ya que, esta proteasa regula la permeabilidad vascular, formación de edemas e inflamación (Leeb-Lundberg *et al.*, 2005). También esta proteína se ha relacionado con isquemia al miocardio (Meneton *et al.*, 2001) y esto de cierta forma apoya lo descrito por Nagase (1999) y colaboradores donde reportaron que ZMIZ1 presenta una alta expresión en corazón y cerebro, lo cual puede indicar que ZMIZ1 regula la expresión *KLK1* en estos órganos.

P2RX6, es un receptor que participa como un canal de iones y se une al ATP. Tras un trauma cerebrovascular o enfermedades neurodegenerativas (Eng *et al.*, 1987; Norenberg, 1994; Eng *et al.*, 2000), incrementa la expresión de la proteína fibrilar ácida de la glia o GFAP, y por ende, hay una mayor proliferación de los astrocitos, ya que se eleva la concentración de ATP (Rathbone *et al.*, 1992; Abbracchio *et al.*, 1994; Neary *et al.*, 1994). Además *P2RX6* se une a los receptores *P2AX*, los cuales se cree que regulan, la activación de AKT y ERK, debido a que estos receptores pueden activar a sus predecesores PI3-K y MEK, respectivamente (Neary, *et al.*, 2003). *P2X6* junto con *P2X2* participan en la diferenciación de células progenitoras neuronales, ya que presenta una elevada expresión en cultivos de neuro-esferas sometidos a una diferenciación neuronal

dirigida. Estos cultivos consisten en agregar células progenitoras neuronales en ausencia de factores de crecimiento epidérmicos y de fibroblastos, y de sustancias mitógenas (activación de las MAPK/ERK), para evitar el crecimiento de células gliales, ya que éstas inhiben la proliferación de células neuronales (Shwindt *et al.*, 2011). También estos receptores regulan la concentración de calcio y la activación de CREB, el cual regula la proliferación, diferenciación, la respuesta de supervivencia en neuronas maduras, plasticidad sináptica, aprendizaje y memoria a largo plazo (Silva *et al.*, 1998, Kandel 2001; León *et al.*, 2006). Además, P2X6 presenta una alta expresión durante la neurogénesis post-natal (Cheung *et al.*, 2005; da Silva *et al.*, 2007) lo cual podría indicar porque ZMIZ1 presenta una expresión muy similar a la de embrión en cerebros de rata.

PIK3Ca es un gen que codifica a PI3K, la cual es una cinasa que es activada a través, de los receptores tirosina cinasa en respuesta a varios factores de crecimiento (EGF, IGF, insulina, VEGFA y PDGF) y estímulos externos. Y posiblemente también sea activada por P2RX6 y los receptores regulados por KLR1. Una vez activada PI3KCA, este fosforilará a PIP3, dando como resultado la activación de AKT, el cual activará otros efectores, como CREB (Du y Montminy., 1988; Pugazhenti *et al.*, 2000; Engelman *et al.*, 2006), que le permitirán regular el crecimiento, la proliferación, supervivencia y motilidad celular (Engelman 2006; Cain y Ridley, 2009). Las rutas en las que se vio involucrado a PI3KCa, de acuerdo, a lo arrojado por Wikipathways, son en las vías de señalización de EGFR, ErbB e insulina. EGFR y ErbB, son receptores de factores de crecimiento epidérmicos que se expresan en células progenitoras neuronales, estimulando la

proliferación, supervivencia, migración y diferenciación preferencialmente al linaje de oligodendrocitos. Una disminución en los niveles de EGF y de dopamina, se asocian con esquizofrenia, debido a malformaciones en la oligodendrogénesis y en la mielina. La dopamina promueve la trans-activación del receptor EGF, aumentando la proliferación de células precursoras neurales. Además, la familia de los receptores ErbB son importantes reguladores de la oligodendrogénesis inducida por dopamina (Galvez *et al.*, 2013). También el receptor EGF, puede ser trans-activado, tras una isquemia o reperfusión (radicales libres) cerebral, observándose, que AKT inhibe la vía de las MAPK/ERK, al fosforilar RAF-1 en su sitio inhibitorio de fosforilación, lo cual ocasiona un decremento en la actividad de las MAPK/ERK (Zhou *et al.*, 2015). Esto concuerda con lo observado por Neary y cols., (2003), ellos encontraron que la actividad de ERK, se reducía alrededor de un 62%, después de inducir daño mecánico en astrocitos, tratados con radicales libres. La inhibición de la vía MAPK/ERK reduce daños celulares inducidos por la reperfusión, como muerte neuronal. Es de agregar, que la expresión de la ubiquitina Cbl-c se vio afectada, por la inhibición de *ZMIZ1*. Esta ubiquitina regula la degradación de EGFR e IGFR (Keane *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2012), tras su activación por la unión a ligandos, de manera que controla la biogénesis de insulina, mediante la regulación de IGFR (Yu *et al.*, 2012). Además, Cbl-c en conjunto con CD2AP (proteína que se une a los filamentos de actina y a una variedad de proteínas de la membrana celular) regula la degradación de Ret, que al igual que EGF pertenece a la familia de los receptores tirosina cinasa. Ret se une a GDNF y este ligando tiene un papel crítico en el desarrollo del sistema

nervioso y su mantenimiento (Tsui y Pierchala, 2008). Por otro lado, PI3KCa, también participa en la vía de la insulina/IGF-1 (en español, factor de crecimiento insulínico tipo 1). En cerebro, altas concentraciones de insulina inducen a diferenciación de las células madres neuronales postnatales (Arsenijevic y Weiss, 1998) y en cultivos embrionarios la insulina e IGF-1 conducen a una mayor producción de neuronas durante la diferenciación, en comparación con cultivos estimulados solo con IGF-1 (Han *et al.*, 2008). Ya que, IGF promueve la proliferación y reduce la capacidad de diferenciación en células progenitoras neuronales adultas, a través de CREB, el cual es estimulado por FGF-2 (Peltier *et al.*, 2007; y Rafalski y Brunet 2011) y AKT inhibiendo la vía de las MAPK/ERK, dando como lugar una disminución de la expresión de GFAP y β -tubulina III, marcadores gliales y neuronales, respectivamente.

Además, AKT activa a mTOR, el cual regula ciertas acciones celulares de PI3K/AKT y está involucrado en el crecimiento neuronal normal, promoviendo la diferenciación, la elongación y ramificación de las neuritas, y formación sináptica durante el neurodesarrollo (Takei y Nawa, 2014). AKT, también regula de manera negativa a FoxO, el cual es un factor de transcripción que al estar fosforilado se ubica en el citoplasma, evitando así su actividad transcripcional. Este factor de transcripción tiene una importante función en diferentes tejidos, permitiendo la supervivencia y respuesta de defensa contra el estrés oxidativo, también promueve la capacidad en células neuronales progenitoras de auto renovarse y mantenerse en estado de multipotente (Rafalski y Brunet, 2011). A PI3KCa también se le ha visto implicado en el Síndrome de Macrocefalia Malformación

capilar, el cual es causado por mutaciones en PIK3Ca y está positivamente correlacionado con una alta expresión del factor de crecimiento vascular (VEGF) (Salajegheh, 2016).

Otra de las rutas arrojadas por Wikipathways, es la ruta del metabolismo del carbono y la metilación. Alteraciones en la ruta del carbono pueden dar lugar a la neurodegeneración y cáncer, ya que esta ruta, está involucrada en la biosíntesis de nucleótidos, precursores de reparación del ADN y producción de la S-adenosilmetionina que es una fuente de grupos metilo para diversos procesos biológicos, tales como la metilación del ADN, el cual es un paso crítico para la estabilidad genómica (Hazra *et al.*, 2009; Fowler *et al.*, 2012). La S-adenosilmetionina es producida través de la metionina adenosiltransferasa 1 (Mat1a) en conjunto con ATP. Interesantemente, esta enzima se encontró también sub-expresada tras la inhibición de *ZMIZ1*. Alteraciones en la Mat1a, dan lugar a anomalías en la materia gris de cerebro, problemas neurológicos incluyendo desmielinización cerebral, por un proceso aún no conocido (Chamberlin *et al.*, 2000).

Por otro lado, la proteína sináptica Syndig1, también se vio implicada por la inhibición de *ZMIZ1*. Syndig1 es una proteína que regula la sinapsis, al participar como una subunidad auxiliar de los receptores AMPA y NMDA (Kalashnikova *et al.*, 2010; Lovero *et al.*, 2013). Estos receptores juegan un papel crítico en el desarrollo del sistema nervioso central, participando en procesos de aprendizaje, memoria, neuroplasticidad y cognitivos (Blanke y Van Dongen; 2009; Henley *et al.*, 2013). Estos procesos son regulados por la activación de la vía MAPK, ya que

estos receptores actúan como canales de cationes, entre estos cationes se encuentra el calcio, el cuál actúa como segundo mensajero permitiendo la activación de CREB a través de ERK/MAPK (Mao, *et al.*, 2004). Una anormal expresión de estos receptores implica numerosos desórdenes neurológicos y condiciones patológicas. También los receptores AMPA y NMDA se han visto implicados en enfermedades neurodegenerativas durante la vejez (Blanke y Van Dongen; 2009; Oquero *et al.*, 1999).

Otro gen importante para la excitabilidad neuronal es *KCNMA1*, encontrándose sub-expresado, tras la inhibición de *ZMIZ1*. *KCNMA1*, codifica canales de potasio sensibles a calcio, que son ampliamente distribuidos en el SNC en la etapa postnatal, jugando un importante papel en la regulación de la actividad de los circuitos del cerebro y de la médula espinal. Estos canales pueden suprimir la liberación de neurotransmisores desde las terminales pre-sinápticas, además en neuronas pueden regular la forma, la frecuencia y la propagación del potencial de acción, así como, la transcripción de genes y morfología nuclear. Mientras que en astrocitos y en músculo liso pueden regular el flujo de sangre cerebral y por lo tanto la actividad cerebral. *KCNMA1* también se ha visto implicado en desórdenes en el SNC, tales como, epilepsia, ataxia, retraso mental y discinesia paroxística cinesigénica (movimientos involuntarios) (Contet *et al.*, 2016). Además, altos niveles de glucosa inducen la liberación de insulina, regulada por estos canales en células beta del páncreas (Fridlyand *et al.*, 2013). Pero aún no se sabe si también se incrementan los niveles de insulina en cerebro.

COX62a también está implicado en la neurodegeneración, el cual asimismo se encontró sub-expresado por la inhibición de *ZMIZ1*. COX62a cataliza la transferencia de electrones desde el citocromo C al oxígeno y está involucrado en la homeostasis del cobre y hierro en cerebro (desregulación de la homeostasis de metales está asociado con Alzheimer) (Myhre *et al.*, 2013). La sub-expresión de Cox62a en músculo esquelético, aumenta el estrés oxidativo, el cuál activa a PGC-1 α y AMPK, aumentando la biogénesis mitocondrial y la sensibilidad a insulina. Además, la expresión deficiente de COX62a protege de la resistencia a insulina e intolerancia a la glucosa y la obesidad provocado por una dieta alta en grasas (Quintens *et al.*, 2013). En cerebro, PGC-1 α es activado por CREB al ser este blanco del BDNF (factor neurotrófico derivado de cerebro), dando lugar a un aumento de la formación de espinas dendríticas (Cheng *et al.*, 2012). Aunque el papel de COX62a no se conoce del todo en cerebro, sería interesante saber si la sub-expresión de este gen, aumenta la expresión de PGC-1 α , y si este potencia la sensibilidad a IGF e insulina, a través de la vía de AKT, dando lugar a la diferenciación de las células madres progenitoras neuronales.

OPCML, ODF4 y SPZ1 son genes que están involucrados en cáncer y también se encontraron afectados por la inhibición de *ZMIZ1*. *OPCML* es un gen supresor de tumores, encontrándose principalmente involucrado en gliomas, tras su inactivación por la metilación de sus islas CpG (Cui *et al.*, 2008). Pertenece a la familia IgLON, las cuales forman parte del grupo de la super-familia de las inmunoglobulinas. Estas proteínas son glicosiladas y se unen a la membrana lipídica por el anclaje a glicosilfosfatidilinositol. Son particularmente abundantes en

cerebro, jugando un papel importante en diversas etapas del desarrollo de este órgano (Sugimoto *et al.*, 2012). OPCML al sobre-expresarse incrementa el tamaño y la proliferación celular de los astrocitos y esto posiblemente sea a través del FGF-2 (factor de crecimiento de fibroblastos), mediante la activación de la vía de las MAPK (Sugimoto *et al.*, 2012). También está involucrado en la formación de la sinapsis en las dendritas, ya que es una molécula de adhesión sináptica que se localiza en la superficie, lo cual le permite regular la sinaptogénesis en respuesta a la actividad neuronal (Yamada *et al.*, 2007) y además, se le ha visto relacionado con esquizofrenia (O'Donovan *et al.*, 2008). Por otro lado, ODF4 es una proteína que se localiza en las densas fibras externas de las colas de espermias maduros (Kitamura *et al.*, 2003). Es utilizado como un biomarcador, ya que los antígenos de cáncer de testículos presenta una amplia expresión en una variedad de tumores (Kazemi-Oula *et al.*, 2015). Aunque aún no está dilucidado su papel en cerebro, esta proteína también se expresa en la corteza de roedores y en estudios realizados por Khan y colaboradores en el 2012, observaron que el timerosal inhibe la actividad de la enzima D2 en la etapa perinatal. D2 es una seleno-enzima que convierte a la pro-hormona de la tiroxina en la forma activa. Ellos encontraron que había un incremento de la expresión de Odf4 el cual es regulado de manera negativa por la tiroxina activa y este podría estar vinculado con un decremento en el aprendizaje motor (Khan *et al.*, 2012 y Sulkowski *et al.*, 2011). Por su parte, Spz1 es un factor de transcripción específico de testículos (Hsu *et al.*, 2001), pero al igual que ODF4 presenta una amplia expresión en una variedad de tumores, por lo tanto es un potencial biomarcador para cáncer (Sammut *et al.*, 2014), varios de

estos biomarcadores actúan de diferentes formas, ya sea mostrando resistencia a los agentes quimioterapéuticos, promoviendo la unión de las histonas a sitios de unión para P53, otros potencian la actividad del receptor de andrógenos (AR), dando lugar al crecimiento del tumor o actuando como represores de la diferenciación y regulando genes implicados en la proliferación celular (Fratta *et al.*, 2011) como tal es el caso de SPZ1, el cuál es fosforilado y activado por la ruta de las MAPK, a través de Ras. Spz1 a través de su blanco PCNA (antígeno nuclear de proliferación celular) potencia la proliferación celular y la tumorigénesis, mientras que condiciones normales controla el crecimiento y la diferenciación celular y PCNA está involucrado en el control del ciclo celular, progresión del tumor, replicación del ADN y reparación del ADN (Hsu *et al.*, 2005).

Otros genes que no están directamente involucrados en el SNC, pero que se encontraron sub-expresados, son *CHRNA9*, el cual pertenece a la familia de canales iónicos activados por ligandos y a la superfamilia de receptores nicotínicos, participando en el desarrollo de las células ciliadas de la cóclea (situado en el oído interno) y también se expresa en las células ciliadas externas (NCBI, 2012). Además, se encontraron genes implicados en el olfato, como los receptores olfatorios 108 y 1567 acoplados a las proteínas G, los cuales interactúan con complejos aromáticos en la nariz, para iniciar una respuesta neuronal que desencadena la percepción del olor (NCBI, 2008^{ab}). Por otra parte, también se encontraron a *EML6* y *TBCEL*, los cuales están relacionados con la tubulina, pero no hay información al respecto (NCBI, 2016^{ab}). Por último, se tiene a *PHEX*, el cual codifica a una endopeptidasa transmembranal, este gen se cree

que está involucrado en la mineralización del hueso y la dentina, y reabsorción del fosfato renal (NCBI, 2013). Estos genes quizás tienen funciones importantes en el sistema periférico, debido a que las células de glioblastoma dan lugar tanto a células del SNC como del SNP, es probable que por ello el microarreglo de expresión arrojará estos datos, aunque es importante indicar que hay poca información sobre estos genes y no se puede saber a ciencia cierta si son exclusivos del sistema periférico o desempeñan alguna función en el SNC.

Aunque aún no está claro la forma en que *ZMIZ1* regula la expresión de los genes que en este trabajo se encontraron implicados en el SNC, es importante destacar, que estos genes presentan sitios de unión para factores transcripcionales con los que interacciona *ZMIZ1*, como es P53 (Lee *et al.*, 2007), en los genes *KLK1*, *P2RX6* y *PIK3C* (QIAGEN, 2012). Quizás P53 tiene un papel importante en la regulación de la proliferación y diferenciación de células progenitoras neuronales, a través de la activación de estos genes que participan en la vía de las MAPK, y esto concuerda con lo que menciona Wu (2004) en donde P53 regula la transcripción de ciertos genes importantes para esta vía. Entre otros factores transcripcionales se encuentran las proteínas Smads (Li *et al.*, 2006), las cuales son importantes durante el desarrollo del SNC y durante la diferenciación y mantenimiento de las células cerebrales adultas (orientación y crecimiento de las dendritas y axones) (Ueberham y Arendt, 2013). Entre los genes que presentan sitios de unión para este factor transcripción se encuentra *KCNMA1*, *PDC*, *OPCML* y *SYNDIG1* (QIAGEN, 2012), los cuales se han visto involucrados en la regulación del calcio, excitabilidad neuronal (Beetz, 2009; Contet *et al.*, 2016) o

sinapsis (Yamada *et al.*, 2007; Kalashnikova *et al.*, 2010; Lovero *et al.*, 2013). Asimismo, OPCML presenta sitios de unión para SMARCA4, al igual que HTR1B (QIAGEN, 2012). Tanto en el síndrome de Coffi-Siris (alteraciones en SMARCA4) (Swillen *et al.*, 1995) como en trastorno del límite (ligado a *HTR1B*) se presenta un comportamiento agresivo (Tadic, *et al.*, 2009), quizás esto se debe, que al presentarse alteraciones en *SMARCA4* hay una regulación deficiente de la expresión de *HTRB1* dando lugar a esta característica que presentan en común. Por último, *P2RX6*, *KCNMA1* y *OPCML* son genes presentan sitios de unión para AP-1 o para FRA-1 (pertenece al complejo AP-1) y estos factores transcripcionales están relacionados con las sinapsis normal, el crecimiento y comportamiento de las dendritas, el aprendizaje y memoria a largo plazo (Gass *et al.*, 2004; Alberin *et al.*, 2009; Pérez *et al.*, 2011; Vonhoff *et al.*, 2013), esto se sobrelapa con las funciones que presenta P2RX6, a través de la activación de CREB, como es memoria a largo plazo, aprendizaje y plasticidad sináptica (Silva *et al.*, 1998, Kandel 2001; León *et al.*, 2006). Mientras que OPCML y KCNMA1 (QIAGEN, 2012) participan en la sinapsis en las dendritas y regulación de la excitabilidad neuronal, respectivamente (Yamada *et al.*, 2007; Beetz, 2009). Es importante destacar, que alteraciones en estos factores transcripcionales se sobrelapan con las enfermedades con las que se asocian sus posibles genes blancos. Estas enfermedades están principalmente relacionadas con el SNC. Esto concuerda con lo reportado por Cordóva-Fletes y cols., (2015) donde la haploinsuficiencia de *ZMIZ1*, da lugar a alteraciones neuropsiquiátricas.

Además, *ZMIZ1* se ha visto implicado en diversos tipos de cáncer (Sharma *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2011; Rakowski *et al.*, 2013; Rogers *et al.*, 2013; O'Brien *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014; Pinnell *et al.*, 2015), de modo que esto concuerda con los genes arrojados tras el análisis de inhibición de este gen. Además, es importante destacar, que a pesar de que nuestro modelo de estudio son células de glioblastoma, presenta la expresión de genes que son específicos de testículos al igual que otros tipos de cáncer, siendo uno de ellos importante durante el desarrollo embrionario, permitiéndole a las células de glioblastoma entrar en un estado indiferenciado y aumentar la tasa de proliferación. Sería importante identificar los factores transcripcionales claves que activan estos genes y determinar en qué forma está implicado *ZMIZ1* en la regulación de estos genes, si es por medio de la unión a los factores transcripcionales o mediante la interacción a los complejos de la remodelación de la cromatina.

Todo lo anterior indica que *ZMIZ1* es un gen multidisciplinario que participa en diversos procesos en el SNC que van desde el neurodesarrollo, hasta la homeostasis de este, todo ello a través de las vías de las MAPK o receptores acoplados a las proteínas G. Además, *ZMIZ1* está involucrado en procesos de metilación del ADN para mantener la estabilidad genómica, así como en procesos de reparación del ADN. Alteraciones en alguno de sus genes blancos o en el propio *ZMIZ1*, pueden dar lugar a neurodegeneración o cáncer. En este trabajo se encontró que *ZMIZ1* regula la expresión de antígenos de cáncer de testículos como es el caso de *ODF4* y *SPZ1*, los cuales se expresan en diversos tipos de cáncer que van desde mamá hasta glioblastoma. Todo ello nos da a entender que

ZMIZ1 no solo es importante durante el neurodesarrollo, sino que también es necesario para diversos procesos críticos para la homeostasis del SNC o celular, y que cualquier alteración puede dar lugar cáncer o neurodegeneración.

CAPITULO XI

CONCLUSIONES

- La inhibición de *ZMIZ1*, mediante ARNi se asimila a la haploinsuficiencia esperada de este.
- *ZMIZ1* es un co-activador transcripcional. Al inhibir a *ZMIZ1* se encontraron sub-expresados genes que participan en procesos cognitivos, de memoria a largo plazo y plasticidad sináptica, así como en la regulación de las vías de señalización desencadenadas por la activación de los receptores tirosina cinasa (EGFR e IGFR), que promueven la proliferación y diferenciación neuronal, a partir de las células progenitoras neuronales. Además, de genes que participan en procesos de metilación y reparación del ADN.
- A pesar de lo anterior, las células no muestran claramente cambios en su morfología tras la inhibición aunque parecen proliferar más a las 48 horas.
- Parece regular receptores acoplados a las proteínas G, los cuales actúan como neuromoduladores de las vías de la serotonina y aminas; y estos genes regulan el comportamiento.

- Tras la inhibición de *ZMIZ1*, se encontraron sub-expresados genes que participan en la activación de proteínas específicas de cáncer de testículo.
- La inhibición de *ZMIZ1* en células de glioblastoma (C6), alteró genes que se han relacionado con neurodegeneración, discapacidad intelectual o cáncer
- *ZMIZ1* se encontró altamente expresado en cerebros de embriones y recién nacidos de rata, lo que podría sugerir que dicho gen tiene un papel importante en el neurodesarrollo y otros procesos de mantenimiento en sistema nervioso, respectivamente. En etapas posteriores del desarrollo hubo una disminución de su expresión.

CAPITULO XII

PERSPECTIVAS

- Validar por inmuno-histoquímica los resultados obtenidos mediante PCR tiempo real, con respecto a la expresión de *ZMIZ1* en las diferentes etapas de desarrollo en cerebro y determinar las regiones, en donde se expresa *ZMIZ1* en cerebro.
- Identificar los factores transcripcionales que se unen a los genes afectados, tras la inhibición de *ZMIZ1*, mediante inmuno-precipitación de la cromatina y por estudios de co-precipitación de proteínas, determinar si hay una interacción entre los factores de transcripción que se unen a estos genes y *ZMIZ1*.
- Determinar de forma más precisa los genes involucrados tras la inhibición de *ZMIZ1* en las diferentes etapas de desarrollo. Usando líneas celulares de cerebro embrionarias, de recién nacido y de adulto.

CAPITULO XIII

LITERATURA CONSULTADA

- Abbracchio MP, Saffrey MJ, Hopker V, Burnstock G. (1994) Modulation of astroglial cell proliferation by analogues of adenosine and ATP in primary cultures of rat striatum. *Neuroscience* 59: 67–76.
- Adinolfi E. Capece M. Amoroso F. De Marchi E, Franceschini A. (2015). Emerging roles of P2X receptors in cáncer. *Current Medicinal chemistry*. 22(7): 878-890.
- Alberini CM. (2009). Transcription factors in long-term memory and synaptic plasticity. *Physiological Reviews*. 89:121–145
- Ali Salajegheh. (2016). Angiogenesis in health, Disease and Malignancy. Queensland, Australia Springer. P 241
- Arsenijevic Y, Weiss S. (1998). Insulin-like growth factor-I is a differentiation factor for postmitotic CNS stem cell-derived neuronal precursors: distinct actions from those of brain-derived neurotrophic factor. *Journal of Neuroscience*. 18: 2118–2128
- Beetz N, Harrison MD, BredeM, Zong X, Urbanski M, Sietmann A, Kaufling J, Barrot M, Seeliger MW, Viera-Coelho MA, Hamet P, Gaudet D, Seda O, Tremblay J, Kotchen T, Kaldunski M, Nüsing R, Szabo B, Howard J, Cowley AW, Biel M, Stoll M, Lohse M, Broeckel U, Hein L. (2009). Phosducin influences sympathetic activity and prevents stress-induced hypertension in humans and mice. *The Journal Clinical Investigation* 119(12), 3597-3612.
- Briar. Lasserson, Gabirel y Sharrack. (2004). Sistema nervioso. Segunda edición. España: Editorial Elsevier. p 3.
- Beliakoff J., Lee J., Ueno H., Aiyer A., Weissman I., Barsh G., Cardiff R. and Sun Z. (2008). The PIAS-Like Protein Zimp10 Is essential for Embryonic Viability and Proper Vascular Development. *Molecular and Cellular Biology*. 28 (1).

- Bhoola K, Ramsaroop R, Plendl J, Cassim B, Dlamini Z, Naicker S. (2001). Kallikrein and kinin receptor expression in inflammation and cancer. *Journal of Biological Chemistry*. 382:77–89.
- Blanke ML, Van Dongen AMJ. (2009). Activation Mechanisms of the NMDA Receptor. In: Van Dongen AM, editor. *Biology of the NMDA Receptor*. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; Capítulo 13. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5274/>
- Borgoño CA, Diammandis. (2004). The emerging roles of human tissue kallikreins in cancer. *Nature Reviews cancer*. 4, 876-890
- Broderick DK, Di C, Parrett T, Samuels YR, Cummins JM, McLendon RE, Fults DW, Velculescu VE, Bigner DD, Yan H. (2004). Mutations of PIK3CA in Anaplastic Oligodendrogliomas, high-grade Astrocytomas, and Medulloblastomas. *Cancer Research*. 64:5048-5050.
- Bustamante Zuleta E. (2004). El sistema nervioso desde las neuronas hasta el cerebro humano. Colombia. Editorial Universidad de Antioquia. p. 197.
- Cain RJ, Ridley AJ. (2009). Phosphoinositide 3-kinases in cell migration. *Biology of the Cell*. 101:13–29.
- Capuzello C, Melchionna R, Mangoni A, Tripodi G, Ferrari P, Torielli L, Arcelli D, Helmer-Citterich M, Bianchi G, Capogrossi M, Napolitano M. (2007). Role of rat adducin in angiogenesis: Null effect of the F316Y polymorphism. *Cardiovascular Research* 75: 608-617.
- Chamberlin ME, Ubagai T, Mudd HS, Thomas J, Pao VY, Nguyen TK, Levy HL, Greene C, Freehauf C, Chou JY. (2000). Methionine Adenosyltransferase I/III Deficiency: Novel Mutations and Clinical Variations. *The American Journal of Human Genetics*. 66: 347-355.
- Chen J. (2009). Molecular Basis of Gene Dosage Sensitivity. (Thesis Doctoral). Rice University, Houston, Texas.

- Cheng A, Wan R, Yang JL, Kamimura N, Son TG, Ouyang X, Luo Y, Okun E, Mattson MP. (2012). Involvement of PGC1- α in the formation and maintenance of neuronal dendritic spines. *Nature communications*. 3 (1250): 1-12.
- Cheung KK, Chan WY, Burnstock G. (2005). Expression of P2X purinoceptors during rat brain development and their inhibitory role on motor axon outgrowth in neural tube explant cultures. *Neuroscience*. 133:937–945
- Choi JS, Park HJ, Kim HY, Kim SY, Lee JE, Choi YS, Chun MH, Chung JW, Lee MY. (2005). Phosphorylation of PTEN and Akt in astrocytes of the rat hippocampus following transient forebrain ischemia. *Cell Tissue*. 319:359–366
- Choi K, Yoo M and Han J. (2014). Toward understanding the role of the neuron-specific BAF chromatin remodeling complex in memory formation. *Experimental & Molecular Medicine*. 47, e 155.
- Contet C, Goulding SP, Kuljis DA, Barth AL. (2016). BK Channels in the Central Nervous System. *International review of neurobiology*. 1(28): 281-342.
- Córdova-Fletes *et al.* (2015). A novel t (10; 19) (q22.3;q13.33) leads to ZMIZ1/PRR12 reciprocal fusion transcripts in a girl with intellectual disability and neuropsychiatric alterations. *Neurogenetics*.
- Cui Y, Ying Y, Hasselt A, Ng KM, Yu J, Zhang Q, Jin J, Liu D, Rhim J, Rha SY, Loyo M, Chan ATC, Srivastava G, Tsao GSW, Sellar G, Sung JJY, Sidransky D, Tao Q. (2008). OPMCL is a Broad Tumor Suppressor for Multiple Carcinomas and Lymphomas with frequently Epigenetic Inactivation. *Plos one*. 3(8): 2990-3001.
- Cunningham FG, Leveno KJ, Bloom SL, Hauth JC, Rouse DJ, Spong CY. (2011). *Williams Obstetrics*. (Pérez Tamayo AM, Araiza Martínez ME, Hernández JL, Coltera GE, García Roig FG, traducción). 23 edición. Estados Unidos de América. Editorial: mC Graw Hill. P: 273.
- da Silva RL, Resende RR, Ulrich H. (2007). Alternative splicing of P2X6 receptors in developing mouse brain and during in vitro neuronal differentiation. *Experimental Physiology*. 92:139–145

- Du K, Montminy M. (1998). CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB. *Journal of Biological Chemistry*. 273: 32377–32379
- Eng LF, Reier PJ, Houle JD. (1987). Astrocyte activation and fibrous gliosis: glial fibrillary acidic protein immunostaining of astrocytes following intraspinal cord grafting of fetal CNS tissue. *Progress in Brain Research*. 71: 439–455.
- Eng L.F, Ghirnikar RS, Lee YL. (2000) Glial fibrillary acidic protein: GFAP—thirty-one years (1969–2000). *Neurochemical Research*. 25: 1439–1451.
- Engelman JA, Luo J, Cantley LC. (2006). The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nature Reviews Genetics*. 7:606–619.
- Fawcett J W, Asher RA. (1999). The glial scar and central nervous system repair. *Brain Research Bulletin* 49 (6): 377-91.
- Fowler AK, Hewwtson A, Agrawal RG, Dagda M, Dagda R, Moaddel R, Balbo S, Sanghvi M, Chen Y, Hogue RJ, Bergeson SE, Henderson GI, Kruman I. (2012). Alcohol-induced One-carbon Metabolism Impairment Promotes Dysfunction of DNA Base Excision Repair in Adult Brain. *The Journal of Biological Chemistry*. 287(52): 43533-43542.
- Fratte E, Coral S, Covre A, Parisi G, Colizzi F, Danielli R, Nicolay HJM, Sigalotti L, Maio M. (2011). The biology of cancer testis antigens: Putative function, regulation and therapeutic potential. *Molecular Oncology*. 5(2): 164-182.
- Fridlyand LE, Jacobson DA, Philipson LH. (2013). Ion channels and regulation of insulin secretion in human β -cells. *Islets*. 15(1): 1-15.
- Fox IS. (2011). *Fisiología Humana*. (Bernardo Rivera-Muñoz, Héctor R, Plasnas-González, José L, González-Hernández, trad.). doceava edición. México. Mc Graw Hill. pp:163-169.
- Garner A, Jay BS. (1980). Macromelanosomes in X-linked ocular albinism. *Histopathology* 4: 243–254.

- Gass P, Fleischmann A, Hvalby O et al. (2004). Mice with a fra-1 knock-in into the c-fos locus show impaired spatial but regular contextual learning and normal LTP. *Molecular Brain Research*.130:16–22
- Galvez AY, Hinojosa A, Gonzalez O. (2013). The role of EGFR and ErbB family related proteins in the oligodendrocyte specification in germinal niches of adult mammalian brain. *Frontiers in cellular neuroscience*. 7(28): 1-13
- Gerrig R., Zimbardo P. (2005). *Psicología y vida*. Décimo séptima edición. México: Editorial Pearson Educación. pp: 66, 70 y 398.
- Han J, Wang B, Xiao Z, Gao Y, Zhao Y, Zhang J, Chen B, Wang X, Dai J. (2008). Mammalian target of rapamycin (mTOR) is involved in the neuronal differentiation of neural progenitors induced by insulin. *Molecular and Cellular Neuroscience*. 39: 118–124.
- Hazra A, Kraft P, Lazarus R, Chen C, Chanock SJ, Jacques P, Selhub J, Hunter DJ. (2009). Genome-wide significant predictors of metabolites in the one-carbon metabolism pathway. *Human molecular genetics*. 18(23): 4677-4687.
- Heintz N. (2000). Analysis of mammalian central nervous system gene expression and function using bacterial artificial chromosome-mediated transgenesis. *Human Molecular Genetics*. 9(6): 937-943.
- Henley JM, Wilkinson KA. (2013). Ampa receptor trafficking and the mechanisms underlying synaptic plasticity and cognitive aging. *State of the art*. 15(1): 11-27.
- Hiroshima Y, Miyamoto H, Nakamura F, Masukawa D, Yamamoto T, Muraoka H, Kamiya M, Yamashita N, Suzuki T, Matsuzaki S, Endo I, Goshima Y. (2013). The protein Ocular albinism 1 is the orphan GPCR GPR143 and mediates depressor and bradycardic responses to DOPA in the nucleus tractus solitarii. *British Journal of Pharmacology*. 171: 403-414

- Hsu SH, Hsieh-Li HM, Huang HY, Huang PH, Li H. (2005). Bhlh-ZIP Transcription Factor Spz1 Mediates Mitogen-Activated Protein Kinase Cell Proliferation, Transformation and Tumorigenesis. *Cancer Research*. 65(10): 4041-4050.
- Hsu SH, Shyu HW, Hsieh-Li HM, Li H. (2001). Spz1, a novel Bhlh-Zip protein, is specifically expressed in testis. *Mechanism of Development*. 100(2): 177-187
- Kalashnikova E, Lorca RA, Kaur I, Barisone GA, Li B, Ishimaru T, Trimmer JS, Mohapatra DP, Díaz E. (2010). SYNDIG1: An Activity-Regulated, AMPA-Receptor-Interacting Transmembrane Protein that Regulates Excitatory Synapse Development. *Cell press Neuron*. 65: 80-93.
- Kandel ER. (2001). The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses *Science*, 294: 1030–1038
- Karasinska J, George S, O'Dowd Brian. (2003). Family 1G protein-coupled receptor function in the CNS Insights from gene Knockout mice. *Brain Research Reviews*. 41: 125-152.
- Kazemi.Oula G, Ghafouri-Fard S, Mobasheri MB, Geranpayeh L, Modarressi MH. (2015). Upregulation of *RHOXF2* and *ODF4* expression in Breast Cancer. *The Journal Cell*. 17(3); 471-477.
- Keane MM, Ettenberg SA, Nau MM, Banerjee P, Cuello M, Penninger J, Lipkowitz S. (1999). Cbl-3: a new mammalian cbl family protein. *Oncogene* 18: 3365–3375.
- Khan A, Sulkowski ZL, Chen T, Zavacki AM, Sajdel-Sulkowska EM. (2012). Sex-dependent changes in cerebellar thyroid hormone-dependent gene expression following perinatal exposure to thimerosal in rats. *Journal of physiology and pharmacology*. 63(3), 277-283.
- Kim M, Tezuka T, Tanaka K, Yamamoto T. (2004). Cbl-c suppresses v-Src-induced transformation through ubiquitin-dependent protein degradation. *Oncogene* 23:1645–1655.

- Kitamura K, Miyagawa Y, Iguchi N, Nishimura H, Tanaka H, Nishimune Y. (2003). Molecular cloning characterization of the human orthologue of oppo1 gene encoding a sperm tail protein. *Molecular human reproduction*. 9(5): 237-243
- Lane D, Carson M, Bergmann C, Wyss-Coray. (2007). *Central Nervous System Diseases and inflammation*. Estados Unidos de América. Springer. p:1
- Lee J, Beliakoff J, Sun Z. (2007). The novel PIAS-like protein hZimp10 is a transcriptional co-activator of the p53 tumor suppressor. *Nucleic acid research*. 35(13): 4523-4534.
- Leeb-Lundberg, L.M., Marceau, F., Muller-Esterl, W., Pettibone, D.J., Zuraw, B.L. (2005). International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. *Pharmacological Reviews* 57: 27–77.
- Leon D, Hervas C, Miras-Portugal MT. (2006). P2Y1 and P2X7 receptors induce calcium/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation in cerebellar granule neurons. *European Journal Neuroscience*. 23: 2999-3013
- Li X, Thyssen G, Beliakoff J, Sun Z. (2006). The novel PIAS-like protein hZimp10 enhances Smad transcriptional activity. *The Journal of biological chemistry*. 1(33). 23748-23756.
- Li X, Zhu C, Tu WH, Yang N, Qin H, Sun Z.(2011). ZMIZ1 preferably enhances the transcriptional activity of androgen receptor with short polyglutamine tract. *PLoS One*. 6(9):25040.
- Lindemann L, Ebeling M, Kratochwil NA, Bunzow JR, Grandy DK, Hoener MC. (2005). Trace amine-associated receptors form structurally and functionally distinct subfamilies of novel G protein-coupled receptors. *Genomics*. 85: 372-385.
- Lopez VM, Decatur CL, Stamer WD, Lynch RM, McKay BS (2008). L-DOPA is an endogenous ligand for OA1. *Plos Biology*. 6(9): 1861-1869.

- Lovero K, Blankenship SM, Shi Y, Nicoll R. (2013). SynDIG1 Promotes Excitatory Synaptogenesis Independent of AMPA Receptor Trafficking and Biophysical Regulation. *Plos One*. 8(6). 66171-66178.
- Mao L, Tang Q, Samdani S, Liu Z, Wang JQ. (2004). Regulation of MAPK/ERK phosphorylation via ionotropic glutamate receptors in cultured rat striatal neurons. *The European journal of neuroscience*. 19(5): 1207-1216
- McGraw J, Hiebert, GW, Steeves, JD. (2001). «Modulating astrogliosis after neurotrauma. *Journal of Neuroscience Research* 63 (2): 109-15
- Meneton P, Bloch-Faure M, Hagege AA, Ruetten H, Bergaya S, Ceiler D, Martins I, Salmon G, Boulanger CM, Nussberger J, Crozatier B, Gasc JM, Heudes D, Bruneval P, Doetschman T, Ménard J, Alhenc-Gelas F. (2001). Cardiovascular abnormalities with normal blood pressure in tissue kallikrein-deficient mice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 98: 2634–2639.
- Mergler D, Valciukas JA. (1998). Nervous system. Stellman JM. *Encyclopaedia of occupational health and safety Volume 1*. Cuarta edición. Estados Unidos de América. International labour office, Geneva. p. 7.2.
- Myhre O, Utkilen H, Duale N, Brunborg G, Hofer T. (2013). Metal Dyshomeostasis and Inflammation in Alzheimer's and Parkinson's Diseases: Possible Impact of Enviromental Exposures. Hindawi Publishing Corporation *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 1-19.
- Miller J, Ding S, Sunkin S, et al. (2014). Transcriptional landscape of the prenatal human brain. *Nature* 13185.
- Muñiz-Landeros E. (2006). *Neurología clínica de Rangel Guerra*. (2015). México: Manual moderno.
- NCBI. (2012). Chrna9. Retrieved September 4, 2016, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/55584>
- NCBI. (2016a). EML6. Retrieved August 8, 2016, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/400954>

NCBI. (2013). PHEX. Retrieved September 4, 2016, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5251>

NCBI. (2008a). Olr108. Retrieved August 8, 2016, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/293247>

NCBI. (2008b). Olr1567. Retrieved August 13, 2016, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/287970>

NCBI. (2016b). TBCEL. Retrieved September 4, 2016, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/219899>

Neary JT, Baker L, Jorgensen SL, Norenberg MD. (1994) Extracellular ATP induces stellation and increases GFAP content and DNA synthesis in primary astrocyte cultures. *Acta Neuropathologica*. 87: 8–13.

Neary JT, Kang Y. (2003) Mechanical strain activates protein kinase B/Akt in cultured astrocytes. *Journal of Neurotrauma*. 20: 1104.

Neary JT, Kang Y, Willoughby KA, Ellis EF. (2003) Activation of ERK by stretch induced injury in astrocytes involves extracellular ATP and P2 purinergic receptors *The Journal of Neuroscience*. 23: 2348–2356.

Neary JT, Kang Y, Tran M, Feld J. (2005). Traumatic injury activates protein kinase B/Akt in cultured astrocytes: role of extracellular ATP and P2 purinergic receptors. *J. Neurotrauma*. 22: 491–500.

Neary JT, Whittemore SR., Zhu Q, Norenberg MD. (1994) Destabilization of glial fibrillary acidic protein mRNA by ammonia and protection by extracellular ATP. *Journal of Neurochemistry*. 63: 2021–2027.

Neary JT, Whittemore SR, Zhu Q, Norenberg MD. (1994) Synergistic activation of DNA synthesis in astrocytes by fibroblast growth factor and extracellular ATP. *Journal of Neurochemistry*. 63: 490–494.

Nicole O, Goldshmidt A, Hamill CE, Sorensen SD, Sastre A, Lyuboslavsky P, Hepler JR, McKeon RJ, Traynelis SF. (2005). Activation of protease-activated receptor-1

triggers astrogliosis after brain injury. *Journal of Neuroscience Research*. 25:4319–4329.

Nagase T, Ishikawa K, Kikuno R et al (1999) Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XV. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro. *DNA Res* 6:337–345

Norenberg M.D. (1994.) Astrocyte responses to CNS injury. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*. 53:213–220.

O'Brien KM, Cole SR, Poole C, Bensen JT, Herring AH, Engel LS, Millikan RC. (2014). Replication of breast cancer susceptibility loci in whites and African Americans using a Bayesian approach. *American journal of epidemiology*. 179(3):382-94.

O'Donovan N, Craddock N, Norton H, Williams T, Peirce V, Moskvina I, Nikolov M, Hamshire L, Carroll L, Georgieva S, Dwyer P, Holmans JL, Marchini CC, Spencer B, Howie HT, Leung AM, Hartmann HJ, Moller DW, Morris Y, Shi G, Feng P, Hoffmann P, Propping C, Vasilescu W, Maier M, Rietschel S, Zammit J, Schumacher EM, Quinn TG, Schulze NM, Williams I, Giegling N, Iwata M, Ikeda A, Darvasi S, Shifman L, He J, Duan AR, Sanders DF, Levinson PV, Gejman S, Cichon MM, Nothen M, Gill A, Corvin D, Rujescu G, Kirov MJ, Owen NG, Buccola BJ, Mowry R, Freedman F, Amin DW, Black JM, Silverman WF, Byerley CR. Cloninger. (2008). Identification of loci associated with schizophrenia by genome-wide association and follow-up. *Nature Genetics*. 40: 1053–1055

O'Donnell FE Jr, Hambrick GW Jr, Green WR, Iliff WJ, Stone DL (1976). X-linked ocular albinism. An oculocutaneous macromelanosomal disorder. *Archives Ophthalmology*. 94:1883–1892

Oquero K, Oquero N, Kojima T, Grooms SY, Calderone A, Zheng X, Bennett MV, Zukin RS. (1999). The *Journal of neuroscience*: of the official journal of the Society for Neuroscience. 19(21): 9218-9227.

Ojeda L, Gao J, Hooten KG, Wang E, Thonhoff JR, Dunn TJ, Gao T, Wu P. (2011). Critical role of PI3K/Akt/GSK3 β in moto neuron specification from human neural stem cells in response to FGF2 and EGF". *PloS One*. 6 (8): 23414.

- Organización Mundial de la salud. 10 datos sobre la salud mental. (2015). Consultado el 30 de junio del 2015 en: http://www.who.int/features/factfiles/mental_health/mental_health_facts/es/index1.html
- Organización Mundial de la salud. Invertir en salud mental. (2004). Consultado el 30 de junio del 2015 en: http://www.who.int/mental_health/advocacy/en/spanish_final.pdf
- Ossovskaya V, Bunnett N, (2004). Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease. *Physiol* 84:579–621.
- Palazzolo I, Gliozzi A, Rusmini P, Sau D, Crippa V, et al. (2008) The role of the polyglutamine tract in androgen receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol* 108:245–253.
- Peltier J, O'Neill A, Schaffer D V. (2007). PI3K/Akt and CREB regulate adult neural hippocampal progenitor proliferation and differentiation. *Developmental Neurobiology*. 67 (10): 1348–61.
- Pérez-Cadahía B, Drohic B, Davie JR. (2011). Activation and function of immediate-early genes in the nervous system. *Biochemistry and Cell Biology*. 89:61–73
- Pierce BA. (2009). *Genética un enfoque conceptual*. Tercera edición. Estados Unidos. Editorial medica panamericana. pp: 245-247.
- Pinnell N, Yan R, Cho HJ, Keeley T, Murai MJ, Liu Y, Alarcon AS, Qin J, Wang Q, Kuick R, Elenitoba-Johnson KS, Maillard I, Samuelson LC, Cierpicki T, Chiang MY. *Immunity*. (2015). The PIAS-like Coactivator Zmiz1 Is a Direct and Selective Cofactor of Notch1 in T Cell Development and Leukemia. *Journal immunity*. 43(5):870-83.
- Plun H, Lewis PA, Wood N. (2010). Cancer and Neurodegeneration: Between the Devil and the Deep Blue Sea. *Plos Genetics*. 6(12): 1-8
- Poirier J. (2004). *El sistema Nervioso*. Argentina: Siglo XX1, editores. p: 10.

- Prassas I, Eissa A, Poda G, Diamandis EP. (2015). Unleashing the therapeutic potential of human kallikrein-related serine proteases. *Nature Reviews Drug Discovery*. pp 1-20.
- Pugazhenth S, Nesterova A, Sable C, Heidenreich KA., Boxer LM, Heasley LE, Reusch JE. (2000). Akt/protein kinase B up-regulates Bcl-2 expression through cAMP-response element binding protein. *Journal of Biological Chemistry*. 275: 10761–10766.
- QIAGEN. (2012). EpiTect Chip qPCR primers. Retrieved 2012, from <http://www.sabiosciences.com/chipqpcrsearch.php?app=gene>.
- Qin M, Kang J, Smith CB (2002) Increased rates of cerebral glucose metabolism in a mouse model of fragile X mental retardation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:15758–15763.
- Quintens R, Singh S, Lemaire K, De Bock K, Granvik M, Schraenen A, Vroegrijk IOCM, Costa V, Van Noten P, Lambrechts D, Lehnert S, Van Lommel L, Thorrez L, De Fauder G, Romijn JA, Shelton JM, Scorrano L, Lijnen HR, Voshol PJ, Carmeliet P, Mammen PPA, Schuit F. (2013). Mice Deficient in the Respiratory Chain Gene COX6 α 2 are protected against high-fat diet-induced obesity and insulin resistance. *Plos one*. 8(2): 56719-56733
- Rafalski, VA, Brunet A. (2011). Energy metabolism in adult neural stem cell fate. *Progress in Neurobiology*. 93 (2): 182–203.
- Rakowski LA, Garagiola DD, Li CM, Decker M, Caruso S, Jones M, Kuick R, Cierpicki T, Maillard I, Chiang MY. (2013). Convergence of the ZMIZ1 and NOTCH1 pathways at C-MYC in acute T lymphoblastic leukemias. *Cancer research*. 73(2):930-41.
- Rakowski L, Garagiola D, Li C, Decker M, Caruso S, Jones M, Kuick R, Cierpicki T, Maillard I. and Chiang M. (2013). Convergence of the ZMIZ1 and NOTCH 1 pathways at C-MYC in acute T lymphoblastic leukemias. *Cancer Research*. 73; 930

- Rathbone MP, Middlemiss P.J, Kim J.L., *et al.* (1992) Adenosine and its nucleotides stimulate proliferation of chick astrocytes and human astrocytoma cells. *Neuroscience Research*. 13: 1–17.
- Rodríguez-Magadán H., Merino E., Schnabel D., Ramírez L., Lomelí H. (2008). Spatial and temporal expression of Zimp7 and Zimp10 PIAS-like proteins in developing mouse embryo. Elsevier. *Gene Expression Patterns* 8, 206-213.
- Rogers LM, Riordan JD, Swick BL, Meyerholz DK, Dupuy AJ. (2013). Ectopic expression of Zmiz1 induces cutaneous squamous cell malignancies in a mouse model of cancer. *The Journal of investigative dermatology*. 133(7):1863-9.
- Ropers Hans-Hilger. (2007). New perspectives for the elucidation of genetic disorders. *Perspectives in human genetics*. 81, 199-207
- Saitoh M, Takayanagi R, Goto K, Fukamizu A, Tomura A, *et al.* (2002) The presence of both the amino- and carboxyl-terminal domains in the AR is essential for the completion of a transcriptionally active form with coactivators and intranuclear compartmentalization common to the steroid hormone receptors: a three-dimensional imaging study. *Mol Endocrinol* 16: 694–706
- Sammut SJ, Feichtinger J, Stuart N, Wakeman JA, Larcombe L, Ramsay J, McFarlane. (2014). A novel cohort of cancer testis biomarker genes revealed through meta-analysis of clinical data sets. *Oncoscience*. 1(5): 349-359.
- Sampedro Nieto M., (2003). Plasticidad neural. *Mente y cerebro*. 3: 72-80.
- Sanes DH, Reh TA, Harris W. (2012). Development of the nervous system. Tercera edición. Reino Unido. Elsevier. p.49.
- Santen G, Kriek M, Attikun H. (2012). SWI/SNF complex in disorder. *Epigenetics*. 7(11): 129-1224.
- Scarisbrick IA, Linbo R, Vandell A, Keegan M, Blaber SI, Blaber M, Sneve D, Lucchinetti CF, Rodriguez M, Diamandis EP. (2008). Kallikreins are associated with secondary progressive multiple sclerosis and promote neurodegeneration. *Journal of Biological Chemistry*. 389:739–745.

- Selcher JC, Weeber EJ, Christian J, Nekrasova T, Landreth GE, Sweatt JD. (2003). A role for ERK MAP kinase in physiologic temporal integration in hippocampal area CA1. *Learning and Memory*. 10:26–39.
- Schwindt TT, Trujillo CA, Negraes PD, Lameu C, Ulrich H. (2011). Directed Differentiation of Neural Progenitors into Neurons Is Accompanied by Altered Expression of P2X Purinergic Receptors. *Journal of Molecular Neuroscience*. 44: 141-146
- Sharma M, Li X, Wang Y, Zarnegar M, Huang CY, Palvimo JJ, Lim B, Sun Z. (2003). hZimp10 is an androgen receptor co-activator and forms a complex with SUMO-1 at replication foci. *The EMBO Journal*. 22(22):6101-6114.
- Silva AJ, Kogan JH, Frankland PW, Kida S. (1998). CREB and memory *Annual Review Neuroscience.*, 21: 127–148
- Sokolov M, Strissel KJ, Leskov IB, Michaud NA, Govardovskii VI, ArhovskyVY. (2004). Phosducin facilitates light driven transducin translocation in rod photoreceptors. Evidence from the phosducin knockout mouse. *Journal of Biological Chemistry*. 279:19149–19156.
- Sofroniew MV. (2009). Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends in Neurosciences* 32 (12): 638-647
- Soler G., Weiss R., Abdelali B., Manlaoui N., Poceau F., Macintyre A., Vekemans V., Bernard A. and Romana S. (2008). Fusion of *ZMIZ1* to *ABL1* in B-cell acute lymphoblastic leukaemia with a t(9;10) (q34;q22.3) translocation. 22, 1278-1280.
- Sorensen SD, Nicole O, Peavy RD, Montoya LM, Lee CJ, Murphy TJ, Traynelis SF, Hepler JR. (2003). Common signaling pathways link activation of murine PAR-1, LPA, and S1P receptors to proliferation of astrocytes. *Molecular Pharmacology*. 64:1199–1209.
- Stefanini ACB, Rodrigues B, Henrique T, Tajara EH. (2015). Involvement of Kallikrein-Related Peptidase in Normal and Pathologic Processes. Hindawi publishing corporation *Diseases Markers*. pp 1-17.

- Sugimoto C, Morita S, Miyata S. (2012). Overexpression of IgLON cell molecules changes proliferation and cell size of cortical astrocytes. *Cell biochemistry and function*. 1-6
- Sulkowski ZL, Chen T, Midha S, Zavacki AM. (2011). Maternal thimerosal exposure results in aberrant cerebellar oxidative stress, thyroid metabolism, and motor behavior in rat pups; sex-and strain-dependent effects. *Cerebellum*. 11: 575-585.
- Swillen A, Glorieux N, Peeters M, Fryns JP. (1995). The Coffin-Siris syndrome: data on mental development, language, behavior and social skills in 12 children. *Clinical Genetics*. 48 (4): 177-182.
- Tadic A, ElsäBer A., Victor A., Cube R., Baskaya O., Wagner S., Lieb K., Höppner W., Dahmen. (2009). Association analysis of serotonin receptor 1B (HTR1B) and brain-derived neurotrophic factor gene polymorphisms in borderline personality disorder. *Journal of Neural Transmission*, 116: 1185-1188.
- Takei N, Hiroyuki N. (2014). mTor signaling and its roles in normal and abnormal brain development. *Frontiers in molecular neuroscience*. 7(28):1-12
- Tsui C, Pierchala B. (2008). CD2AP and Cbl-3/Cbl-c Constitute a Critical Checkpoint in the Regulation of Ret Signal Transduction. *The Journal of Neuroscience*. 28(35): 879-880.
- Tsurusaki Y, Okamoto N, Ohashi H, Kosho T, Imai Y, Hibi-Ko Y, et al. (2012) Mutations affecting components of the SWI/SNF complex cause Coffin-Siris syndrome. *Nature Genetics*. 44: 376–378.
- Uwe Ueberham and Thomas Arendt (2013). The Role of Smad Proteins for Development, Differentiation and Dedifferentiation of Neurons, *Trends in Cell Signaling Pathways in Neuronal Fate Decision*, Dr Sabine Wislet-Gendebien (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/54532. Available from: <http://www.intechopen.com/books/trends-in-cell-signaling-pathways-in-neuronal-fate-decision/the-role-of-smad-proteins-for-development-differentiation-and-dedifferentiation-of-neurons>

- Vonhoff F, Kuehn C, Blumenstock S et al. (2013). Temporal coherency between receptor expression, neural activity and AP-1-dependent transcription regulates *Drosophila* motoneuron dendrite development. *Development*. 140:606–616
- Wang H, Ubl JJ, Reiser G. (2002). Four subtypes of protease-activated receptors, co-expressed in rat astrocytes, evoke different physiological signaling. *Glia*. 37:53–63.
- Wang H, Ubl JJ, Stricker R, Reiser G. (2002) Thrombin (PAR-1)-induced proliferation in astrocytes via MAPK involves multiple signaling pathways. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 283: 1351– 1364.
- Wang Y, Luo W, Reiser G. (2007) Proteinase-activated receptor-1 and -2 induce the release of chemokine GRO/ CINC-1 from rat astrocytes via differential activation of JNK isoforms, evoking multiple protective pathways in brain. *Biochemical Journal*. 401:65–78.
- Willems PJ. (2004). Genetic Hearing Loss. Estados Unidos de América. Marcel Dekker. p:93.
- Wu JI, Lessard J, Olave IA, Qiu Z, Ghosh A, Graef IA, Crabtree GR. (2007). Regulation of dendritic development by neuron-specific chromatin remodeling complexes. *Neuron*. 56(1): 94-108.
- WU SG. (2004).The functional interactions between the p53 and MAPK signaling pathways. *Cancer Biology & Therapy*. 3(2): 156-161.
- Yamada M, Hashimoto T, Hashimoto T, Hayashi N, Higuchi M, Murakami A, Nakashima T, Maekawa S, Miyata S. (2007). Synaptic adhesion molecule OBCAM; synaptogenesis and dynamic internalization. *Brain Research*. 1165: 5-14.
- Yamamuro K, Kimoto S, Rosen KM, Kishimoto T, Makinodan M. (2015). Potential primary roles of glial cells in the mechanisms of psychiatric disorders. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 9(15): 1-11
- Yu Y, Sun Y, Shengqi H, Yan C, Liangyou R, Wenjun L, Yong L. (2012). Neuronal Cbl Controls Biosynthesis of Insulin-Like Peptides in *Drosophila melanogaster*. *American Society for Microbiology Journals*. 32(18): 3610-3623.

Zhang B, Jia WH, Matsuda K, Kweon SS, Matsuo K, Xiang YB, Shin A, Jee SH, Kim DH, Cai Q, Long J, Shi J, Wen W, Yang G, Zhang Y, Li C, Li B, Guo Y, Ren Z, Ji BT, Pan ZZ, Takahashi A, Shin MH, Matsuda F, Gao YT, Oh JH, Kim S, Ahn YO, Chan AT, Chang-Claude J, Slattery ML, , Gruber SB, Schumacher FR, Stenzel SL, Casey G, Kim HR, Jeong JY, Park JW, Li HL, Hosono S, Cho SH, Kubo M, Shu XO, Zeng YX, Zheng W. (2014). Large-scale genetic study in East Asians identifies six new loci associated with colorectal cancer risk. *Nature Genetics*. 46(6):533-42.

Zhou J, Du T, Li B, Rong Y, Verkhatsky A, Peng L. (2015). Crosstalk between MAPK/ERK and PI3K/AKT signal pathways During Brain Ischemia/Reperfusion. *American Society for Neurochemistry*. 1-16.

CAPITULO XIV

ANEXOS

Anexo I. Condiciones de cultivo celular de la línea de glioblastoma C6 de rata.

Composición medio DMEM suplementado:

- Aminoácidos no esenciales.
- L-Glutamina (2 mM)
- Medio Advanced DMEM.
- Penicilina/Estreptomicina (100 U/mL y 10 mcg/mL)
- Suero Bovino fetal (10%)

Procedimiento siembra de las células de glioblastoma C6:

1. Descongelar el vial con células en un baño de agua a 37°C
2. El contenido del vial se transfiere a un tubo de 15 mL y se mezcla con 10 mL de medio DMEM suplementado.
3. Tomar 5 mL de la suspensión de células y depositar esta suspensión en una caja Petri para cultivo de 150 mm y agregar 5 mL de medio DMEM suplementado.
4. Incubar la caja Petri a 37°C, con 5% de CO₂.
5. Una vez que las células se encuentran adheridas y presenten una confluencia de 50%, se procede a cambiar el medio cada 48 horas.

Procedimiento de cambio de medio y conteo celular

1. Retirar el medio de cultivo de la placa Petri.
2. Agregar 3-5 mL de tripsina/EDTA (siempre y cuando la confluencia sea mayor a un 70%, de lo contrario, solo retirar el medio y agregar medio DMEM suplementado nuevo) e incubar por 5 minutos a 37°C la placa Petri, mover suavemente la placa para asegurarnos que gran parte de las células son removidas por la tripsina.
3. Tomar la mezcla de tripsina y células, transferirla a un tubo de 15 mL, y añadir de a 3-5 mL de medio DMEM suplementado (dependiendo de la tripsina agregada) para inactivar a la tripsina. Mezclar suavemente para asegurarnos de neutralizar la tripsina.
4. Centrifugar el tubo de 15 mL a 2500 g por 5 minutos a temperatura ambiente y desechar el sobrenadante.
5. Agregar entre 1-10 mL de medio DMEM suplementado (dependiendo del tamaño del botón celular) para lavar y resuspender el botón celular (repetir el paso 4 y 5 dos veces).
6. Tomar 30 μ L de la suspensión de células y medio, una vez terminados los lavados, depositar la suspensión en un tubo de 0.2 mL y agregar 60 μ L de medio DMEM suplementado y 10 μ L de azul tripano, y mezclar con la micropipeta hasta que esté completamente homogenizado.
7. Añadir 10 μ L de la mezcla a la cámara de Neubauer, para proceder al conteo de células en el cuadrante de glóbulos blancos y determinar el

número de células por mL, a través de la siguiente fórmula: (Factor de dilución de la cámara de Neubauer 10,000) (Promedio de las células en los cuatro cuadrantes) (3.333 dilución de las células).

8. Resuspender las células en el volumen requerido (para obtener la dilución deseada) y tomar 1 mL de esta suspensión y agregarlo a la caja Petri, pero previamente se añaden 9 mL de medio DMEM suplementado en la caja Petri.

Procedimiento de congelamiento de la línea celular

1. Agregar de 3-5 mL de tripsina/EDTA a las células adheridas a la caja Petri e incubar por 5 minutos a 37°C y mezclar suavemente para asegurarse de despegar gran parte de las células.
2. Tomar la suspensión de células y tripsina, transferir esta mezcla a un tubo de 15 mL y añadir medio DMEM suplementado (el mismo volumen que se agregó de tripsina/EDTA) para neutralizar la tripsina.
3. Centrifugar el tubo de 15 mL a 2500 g por 5 minutos a temperatura ambiente y desechar el sobrenadante.
4. Agregar entre 1-10 mL (dependiendo del tamaño del botón celular) de medio DMEM suplementado para lavar y resuspender el botón celular (repetir el paso 4 y 5 dos veces)
5. Determinar el número de células por mL, mediante el uso de la cámara de Neubauer. Tomar el volumen requerido para obtener un millón de células y transferirlo a un tubo de 2 mL.
6. Centrifugar el tubo a 2500 g por 5 minutos.

7. Desechar el sobrenadante y resuspender el botón celular en 1.8mL de suero bovino fetal y 0.2 mL de DMSO.
8. Transferir 1 mL de la suspensión a cada criovial.
9. Congelar las células en el criovial a -20°C por 24 horas, para posteriormente pasarlas a un contenedor de nitrógeno líquido a -80°C .

Anexo II. Transfección reversa usando el agente lipofectante siPORT

NeoFX

Preparación de las células a transfectar.

1. Añadir 5 mL tripsina/EDTA a la placa Petri e incubar por 5 minutos a 37°C.
2. Transferir la suspensión a un tubo de 15 mL e inactivar la tripsina, agregando 5 mL medio DMEM suplementado.
3. Centrifugar a 2500 g por 5 minutos (lavar dos veces con medio DMEM suplementado y centrifugar después de cada lavado)
4. Resuspender el botón celular en 5 mL de medio DMEM suplementado
5. Determinar el número de células por mL (utilizar 40,000 células por pozo) y mantener a 37°C antes de empezar la transfección.

Preparación del Agente lipofectante siPORT NeoFX

1. Atemperar el siPORT NeoFX y el medio DMEM no suplementado.
2. Diluir 1 μ L siPORT NeoFX en medio DMEM no suplementado hasta completar 25 μ L para una sola reacción.
3. Incubar por 10 minutos a temperatura ambiente.

Preparación del ARNi y los complejos ARNi-liposomas

1. Diluir el ARNi en medio DMEM no suplementado a una concentración final de 5 nM, utilizando un volumen de 2.5 μ L de ARNi 1 μ M y aforarlo hasta 25 μ L por reacción con medio DMEM no suplementado.
2. Mezclar el ARNi y el siPORT NeoFX diluido, utilizar la micropipeta para homogenizar suavemente y evitar destruir los liposomas y permitir que haya un mayor número de complejos ARNi-liposomas.
3. Incubar por 10 minutos a temperatura ambiente.
4. Agregar la mezcla a una placa de cultivo con 24 pozos.

Transfección de las células de glioblastoma C6 con los complejos ARNi-liposomas

1. Usar la micropipeta para mezclar gentilmente, las células con los complejos ARNi-Liposomas, (40,000 células en un volumen de 450 μ L, obteniendo un volumen final de 500 μ L).
2. Mover la placa hacia atrás y hacia adelante, para homogenizar adecuadamente las células con los complejos de ARNi-liposomas.
3. Incubar las células transfectadas a 37°C durante 24, 48 y 72 horas. (Cambiar el medio cada 48 horas) con 5% de CO₂.

Anexo III. Extracción del ARN de células de glioblastoma C6 y cerebros de rata, mediante el uso del kit Rneasy lipid tissue mini kit

1. Homogenizar ≤ 100 mg de tejido graso en 1 mL de Qiazol (buffer de lisis) usando el homogeneizador vidrio-vidrio (cerebros) o usando la micropipeta (células de glioblastoma C6).
2. Incubar el homogenizado a temperatura ambiente (15-25°C) por 5 minutos.
3. Adicionar 200 μ L de cloroformo y mezclar vigorosamente por 15 segundos.
4. Incubar la muestra a temperatura ambiente de 2-3 minutos.
5. Centrifugar a 12,000 g por 15 minutos a 4°C.
6. Transferir la fase acuosa superior a un tubo nuevo. Evitar tomar la interfase, añadir un volumen de etanol al 70% y agitar mediante vortex. No centrifugar.
7. Transferir 700 μ L de la muestra a una columna Rneasy Mini Spin del kit y colocarla en tubo de colector de 2 mL. Cerrar la tapa y centrifugar a temperatura ambiente por 15 segundos a $\geq 8,000$ g y desechar el líquido del tubo colector.
8. Usar el mismo tubo colector para la columna y repetir el paso 7, transfiriendo el remanente de la muestra y desechar el líquido del tubo colector, una vez terminado de centrifugar.
9. Adicionar 700 μ L de Buffer Rw1 a la columna Rneasy, cerrar la tapa y centrifugar por 15 segundos a $\geq 8,000$ g y descartar el líquido del tubo colector.

10. Agregar 500 μ L de Buffer RPE a la columna Rneasy. Cerrar la tapa, centrifugar por 15 segundos a $\geq 8,000$ g, desechar el fluido del tubo colector.
11. Añadir 500 μ L de Buffer RPE a la columna de Rneasy. Cerrar la tapa y centrifugar por 2 minutos a $\geq 8,000$ g (opcional: para secar la membrana de la columna, se coloca esta en un nuevo tubo colector de 2 mL y se centrifuga a máxima velocidad por 1 minuto).
12. Colocar la membrana en un nuevo tubo de 1.5 mL y adicionar de 30-50 μ L de agua libre de nucleasas, cerrar la tapa y centrifugar por 1 minuto a $\geq 8,000$ g.

ANEXO IV. Retrotranscripción del ARN extraído de las células de glioblastoma C6 o cerebros de rata

1. Añadir los siguientes reactivos a un tubo estéril de 0.2 mL
 - ✓ 250 ng de random primers
 - ✓ 1 μ g de ARN total
 - ✓ 1 μ L de la mezcla de dNTPS 10 mM
 - ✓ Agua hasta completar 13 μ L
2. Calentar la mezcla a 65°C por 5 minutos en el termociclador e incubar en hielo por al menos 1 minuto.
3. Centrifugar por 10 segundos para coleccionar el contenido del tubo y adicionar los siguientes reactivos:
 - ✓ 4 μ L de buffer 5x first-strand

- ✓ 1 μ L de DTT 0.1M
 - ✓ 1 μ L de rnease Out
 - ✓ 1 μ L Super Script III
4. Mezclar gentilmente por pipeteo e incubar a 25°C por 5 minutos.
 5. Incubar a 50°C por 60 minutos e inactivar la reacción a 70°C por 15 minutos.

Anexo V. Preparación del microarreglo de expresión de un color

Preparación de los Spikes para el microarreglo de expresión

1. Atemperar y agitar vigorosamente el tubo que contiene los Spikes mediante un vortex.
2. Calentar a 37°C el tubo de Spikes en un baño de agua por 5 minutos.
3. Centrifugar por 10 segundos, para que el contenido se coloque en la parte inferior del tubo.
4. Realizar cuatro diluciones seriadas de 1:20, 1:25, 1:20 y 1:2, ya que se partirá de 50 ng de ARN (dependiendo de la concentración de ARN, son las diluciones que se tiene que hacer del Spike, de acuerdo a lo indicado en el protocolo One color Microarray-Based Gene Expression Analysis)

Preparación de la primera dilución

1. Tomar 2 μ L del Stock y agregar 38 μ L del buffer de dilución (proporcionado por el kit) en un tubo de 1.5 mL.
2. Mezclar por vortex la dilución.

3. Centrifugar por 10 segundos el tubo que contiene la primera dilución, para que el contenido se coloque en la parte inferior del tubo.

Preparación de la segunda dilución

1. Tomar 2 μL de la primera dilución y adicionar 48 μL del buffer de dilución en un tubo de 1.5 mL.
2. Mezclar por vortex.
3. Centrifugar por 10 segundos el tubo que contiene la segunda dilución, para que el contenido se coloque en la parte inferior.

Preparación de la tercera dilución

1. Tomar 2 μL de la segunda dilución y adicionar 38 μL del buffer dilución en un tubo de 1.5 mL.
2. Mezclar por vortex.
3. Centrifugar por 10 segundos el tubo que contiene la tercera dilución, para que el contenido se coloque en la parte inferior.

Preparación de la cuarta dilución

1. Tomar 10 μL de la tercera dilución y adicionar 40 μL del buffer de dilución.
2. Mezclar por vortex.
3. Centrifugar por 10 segundos el tubo que contiene la dilución, para que el contenido se coloque en la parte inferior.

Preparación del ARN para el marcaje

1. Agregar 50 ng de ARN total a un tubo de 1.5 mL, en un volumen final de 1.5 μ L.
2. Agregar 2 μ L de la última dilución de los Spikes al tubo de 1.5 mL.
3. Preparar la mezcla de primer T7 (por reacción se utiliza 0.8 μ L de primer T7 y 1 μ L de agua libre de nucleasas, obteniendo un volumen final de 1.8 μ L) en un tubo de 1.5mL.
4. Agregar 1.8 μ L de la mezcla de primer T7, dentro del tubo que contiene el ARN diluido con los spikes. Obteniendo un volumen total de 5.3 μ L.
5. Incubar la mezcla a 65°C en baño de agua por 10 minutos. Colocar la reacción en hielo e incubar por 5 minutos.
6. Precalentar el buffer 5x First Strand a 80°C durante 3 a 4 minutos y mezclar por vortex y centrifugar por 10 segundos, a temperatura ambiente.
7. Preparar y agregar la mezcla de ADNc (utilizar 2 μ L del buffer first strand 5x, 1 μ L de 0.1 M de DTT, 0.5 μ L de la mezcla de dNTPs 10 mM y 1.2 μ L de la mezcla de Affinity Script RNease Block, esto es para una sola reacción).
8. Adicionar 4.7 μ L de la mezcla para ADNc, para cada tubo y mezclar con la micropipeta.
9. Incubar las muestras a 40°C en un baño de agua por 2 horas.
10. Transferir las muestras a 70°C en un baño de agua por 15 minutos.
11. Incubar las muestras en hielo por 5 minutos.
12. Centrifugar por 10 segundos.

13. Preparar la mezcla de transcripción (para una reacción, se utilizan 0.75 μ L de agua libre de nucleasas, 3.2 μ L del buffer 5x de transcripción, 1 μ L de la mezcla de NTP, 0.21 μ L T7 RNA polymerase Blend y 0.24 μ L de Cyanine 3-CTP).
14. Agregar 6 μ L de la mezcla de transcripción a cada tubo. Mezclar gentilmente con la micropipeta, obteniendo un volumen final de 16 μ L.
15. Incubar las muestras en baño de agua a 40°C por 2 horas.

Purificación y marcaje del ARN

1. Adicionar 84 μ L de agua libre de nucleasa, para obtener un volumen total de 100 μ L.
2. Agregar 350 μ L de buffer RLT y mezclar usando la micropipeta.
3. Añadir 250 μ L de etanol (96% a 100% de pureza) y mezclar por pipeteo. No centrifugar.
4. Transferir 700 μ L de la muestra a una columna de Rneasy Mini Spin y colocar la columna en un tubo colector de 2 mL. Centrifugar por 30 segundos a 4°C a 13,000 rpm. Desechar el líquido del tubo colector.
5. Transferir la columna a un nuevo tubo colector y agregar 500 μ L del Buffer RPE a la columna. Centrifugar la muestra a 4°C por 30 segundos a 13, 000 rpm. Desechar el líquido y reusar el tubo colector.
6. Adicionar 500 μ L del Buffer RPE a la columna. Centrifugar a 4°C por 60 segundos a 13,00 rpm. Desechar el líquido y el tubo colector.
7. Colocar la columna en un nuevo tubo colector de 2 mL y centrifugar a 4°C por 30 segundos a 13,000 rpm.

8. Eluir el ARNc purificado a un tubo de 1.5 mL y agregar 30 μ L de agua libre de nucleasas, esperar 60 segundos y centrifugar por 30 segundos a 4°C a 13,000 rpm.

Cuantificación del ARNc

1. Utilizar el nanodrop y blanquear el instrumento, agregando de 1 a 2 μ L de agua libre de nucleasas en el pedestal del nanodrop.
2. Limpiar con una toalla desechable el pedestal y cargar las muestras, determinar el rendimiento y la actividad específica de cada reacción usando la siguiente formula:

$$\frac{(\text{Concentración de ARNc}) \times 30}{1000} = \text{Rendimiento } (\mu\text{g})$$

$$\frac{(\text{Concentración de Cy3}) \times 1000}{\text{Concentración de ARNc}} = \text{Actividad específica}$$

Tabla 8.- Rendimiento y actividad específica utilizados para el microarreglo de expresión (el rendimiento recomendado para un microarreglo de 8 muestras es de 0.825 y la actividad específica ≥ 6).

Muestra	Rendimiento	Actividad específica
Negativo	0.585	10.256
Scramble 1	2.121	7.072
Scramble 2	2.385	6.289
Scramble 3	2.124	7.062
ARNi 1	2.235	9.395
ARNi 1.1	1.668	8.992
ARNi 2	1.368	15.35
ARNi 2.1	936	16.02

Preparación de las muestras para la hibridación en el microarreglo de expresión

1. Preparar la reacción para la hibridación (para una reacción de un microarreglo para 8 muestras se utilizan 600 ng de Cyanine 3-labeled, linearly amplified ARNc, 5 μ L del agente 10 x gene expression blocking, 1 μ L del fragmentation buffer 25x y se afora hasta 25 μ L con agua libre de nucleasas)
2. Incubar la mezcla a 60°C por 30 minutos para fragmentar el ARNc.
3. Incubar en hielo por un minuto.
4. Adicionar 25 μ L del Buffer de hibridación.
5. Mezclar cuidadosamente con la micropipeta, evitar formar burbujas.
6. Centrifugar por 10 segundos a temperatura ambiente a 13,000 rpm.
7. Usar inmediatamente y no almacenar, poner la muestra en hielo y cargar 40 μ L sobre el microarreglo.
8. Colocar la laminilla sobre el gasket y colocarlo en el horno de hibridación a 65°C durante 17 horas.

Lavado del microarreglo de expresión

1. Separar el gasket del microarreglo y sumergir este sobre el contenedor que con buffer 1.
2. Colocar de nuevo el microarreglo sobre el recipiente con buffer 1, el cual deberá estar sobre la plancha de agitación.
3. Sumergir el microarreglo sobre el contenedor con buffer 2, el cual debió ser previamente precalentado a 65°C por 17 horas.
4. Colocar el microarreglo en un holder y realizar el escaneo.

Anexo VI. Vías de señalización afectadas, tras la inhibición de *ZMIZ1*

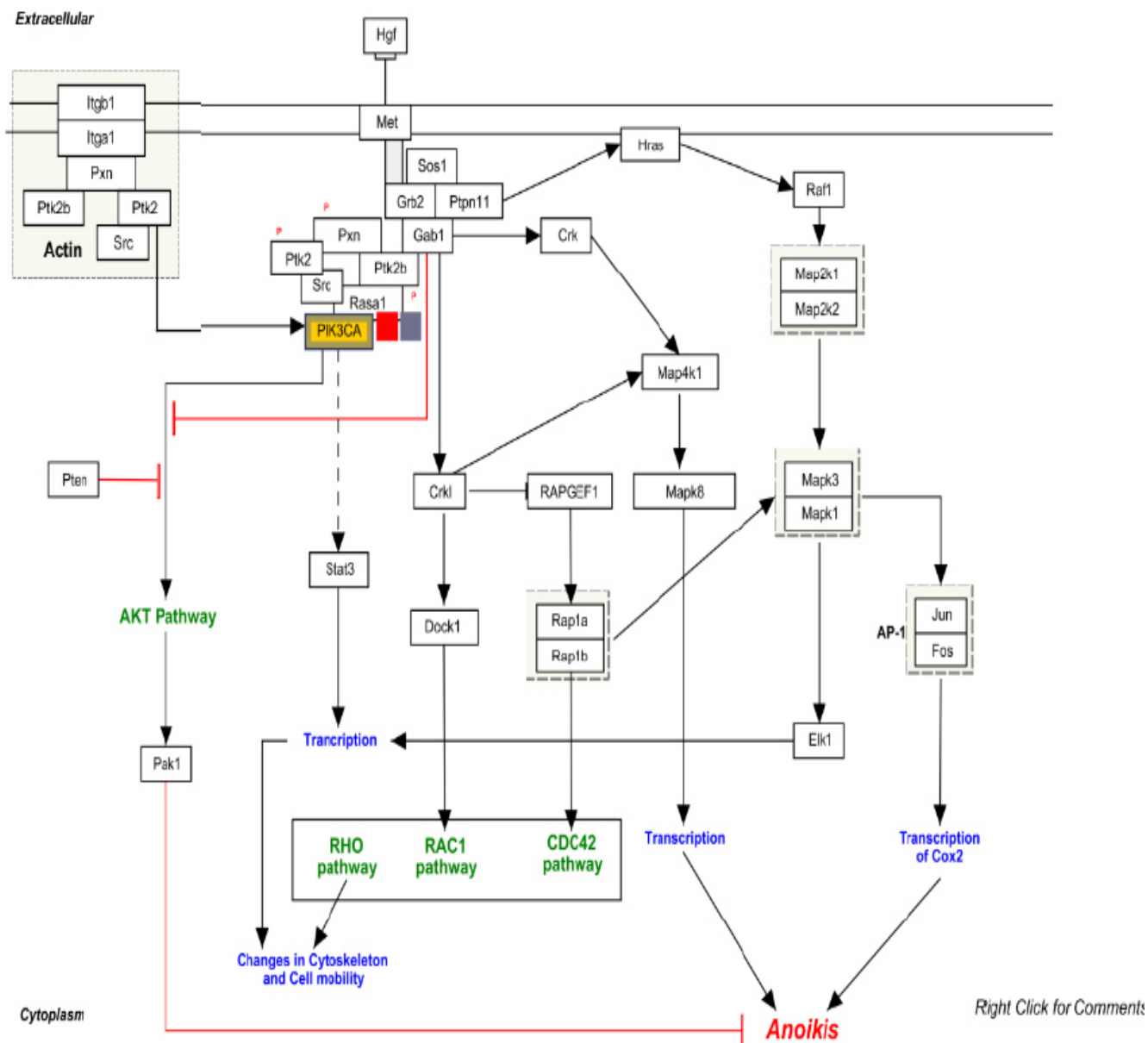


Figura 21.- Vía de señalización de PIK3CA.

ERBB SIGNALING PATHWAY

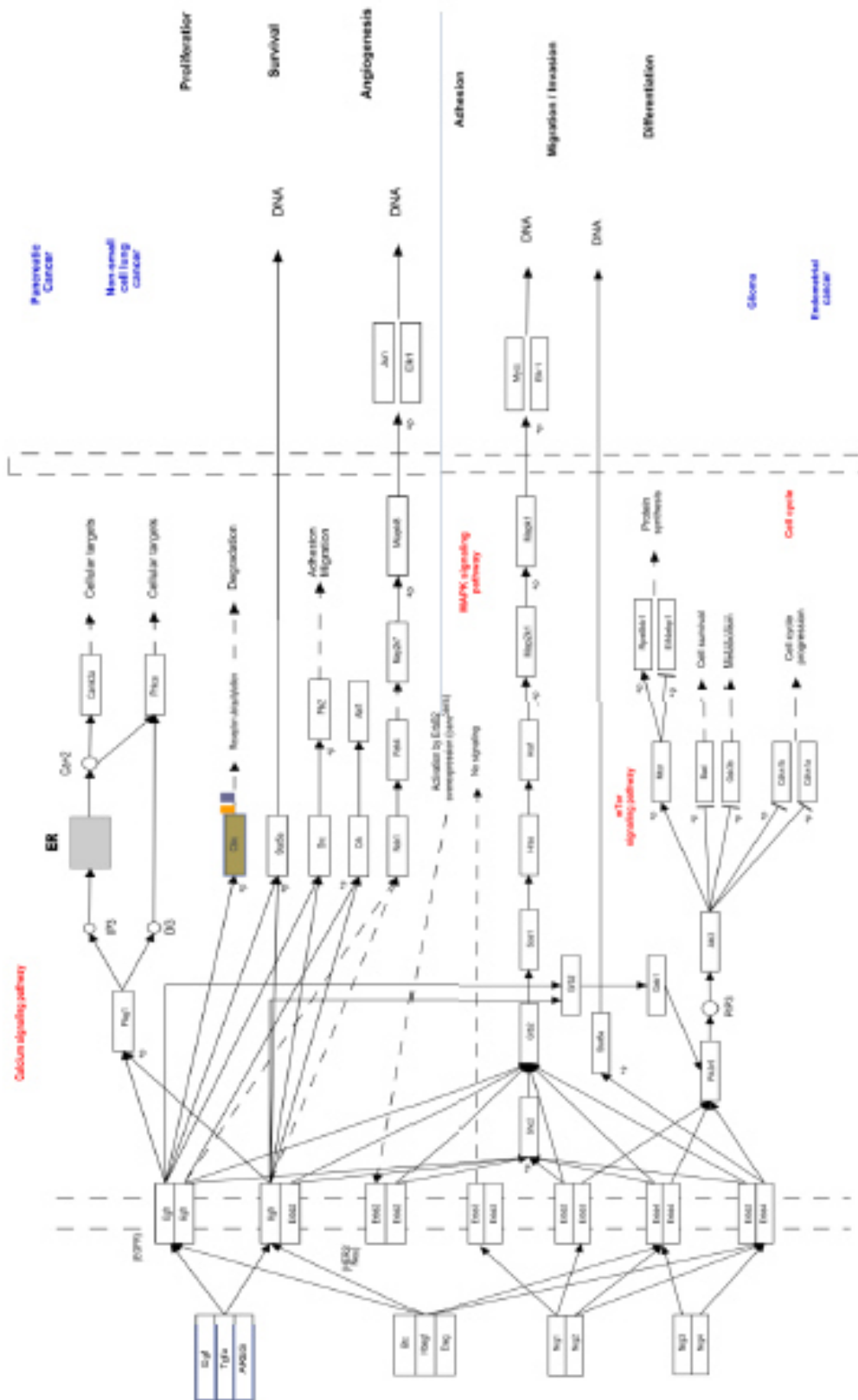


Figura 22.- Vía de señalización de CBLC.

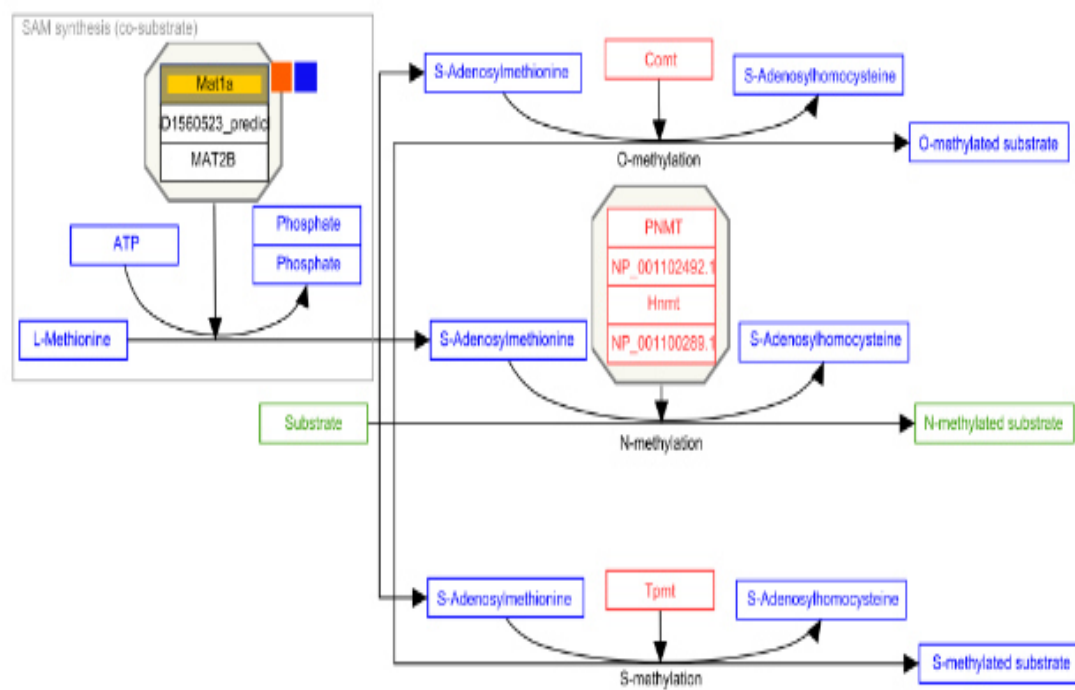


Figura 23.- Vía de señalización de MAT1A.

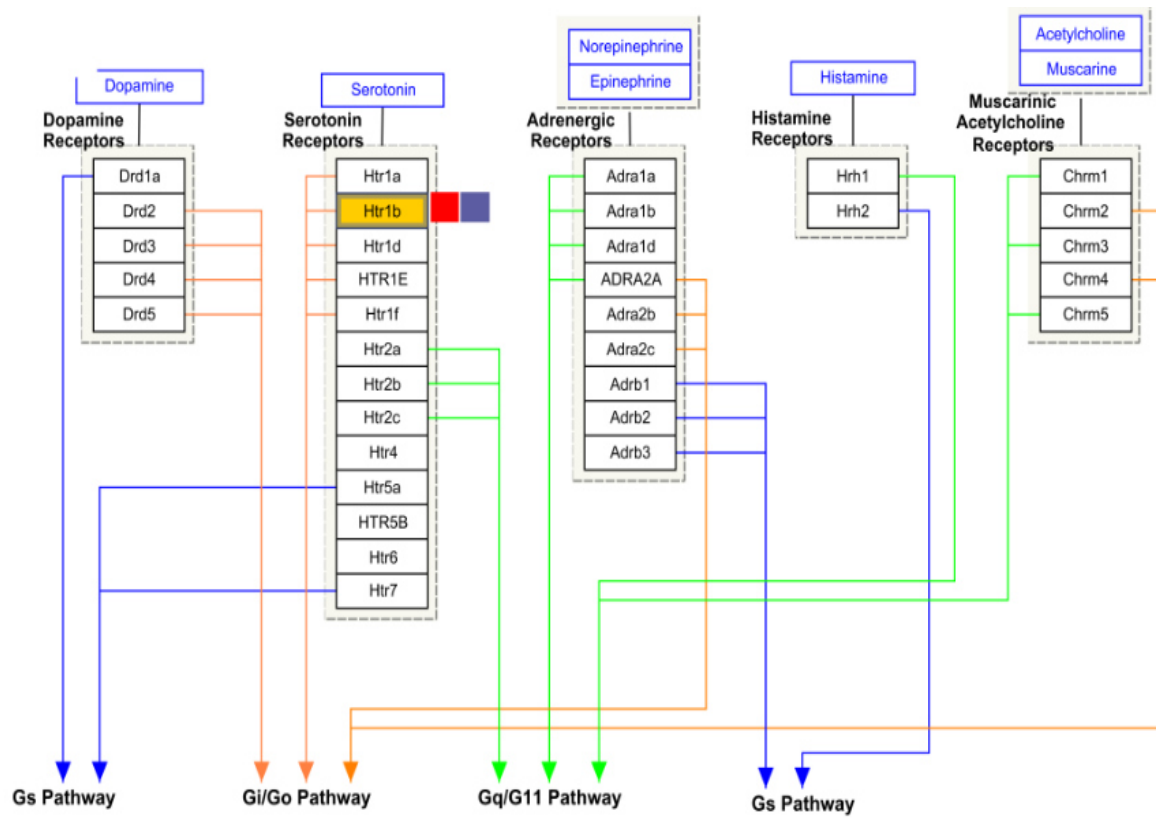


Figura 24.- Vía de señalización de *HTR1B*.

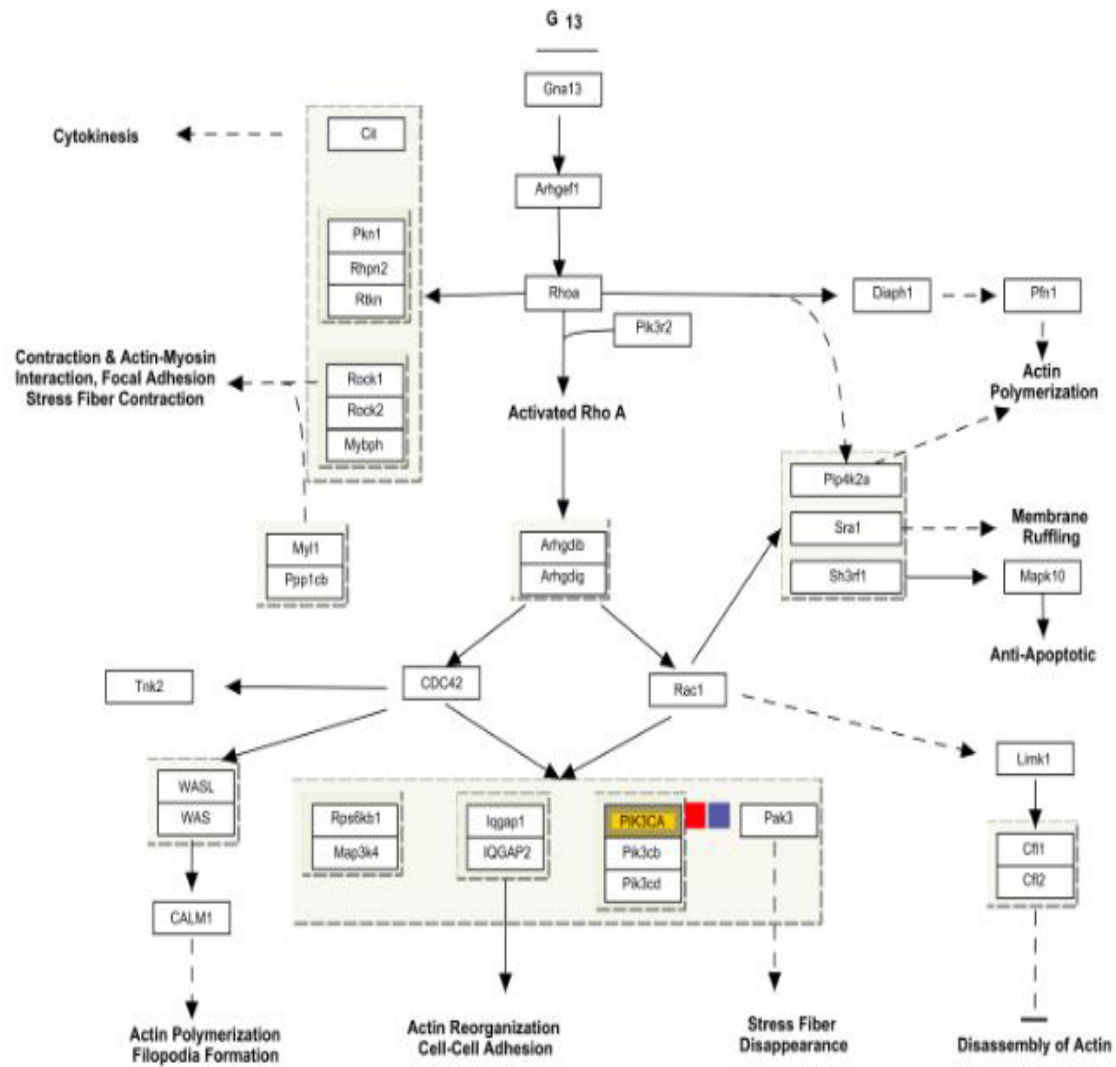
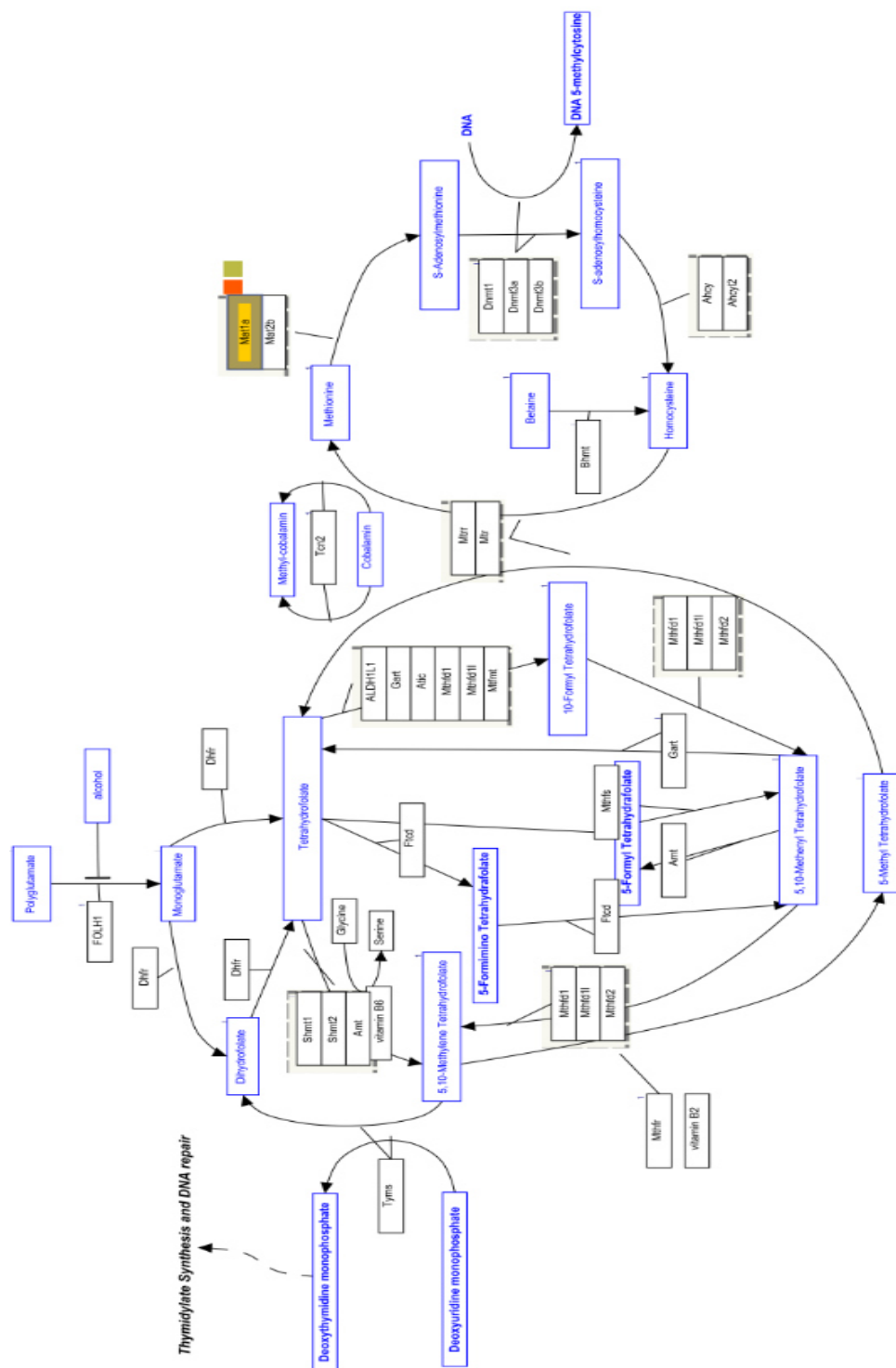


Figura 25.- Vía de señalización de *PIK3CA*.



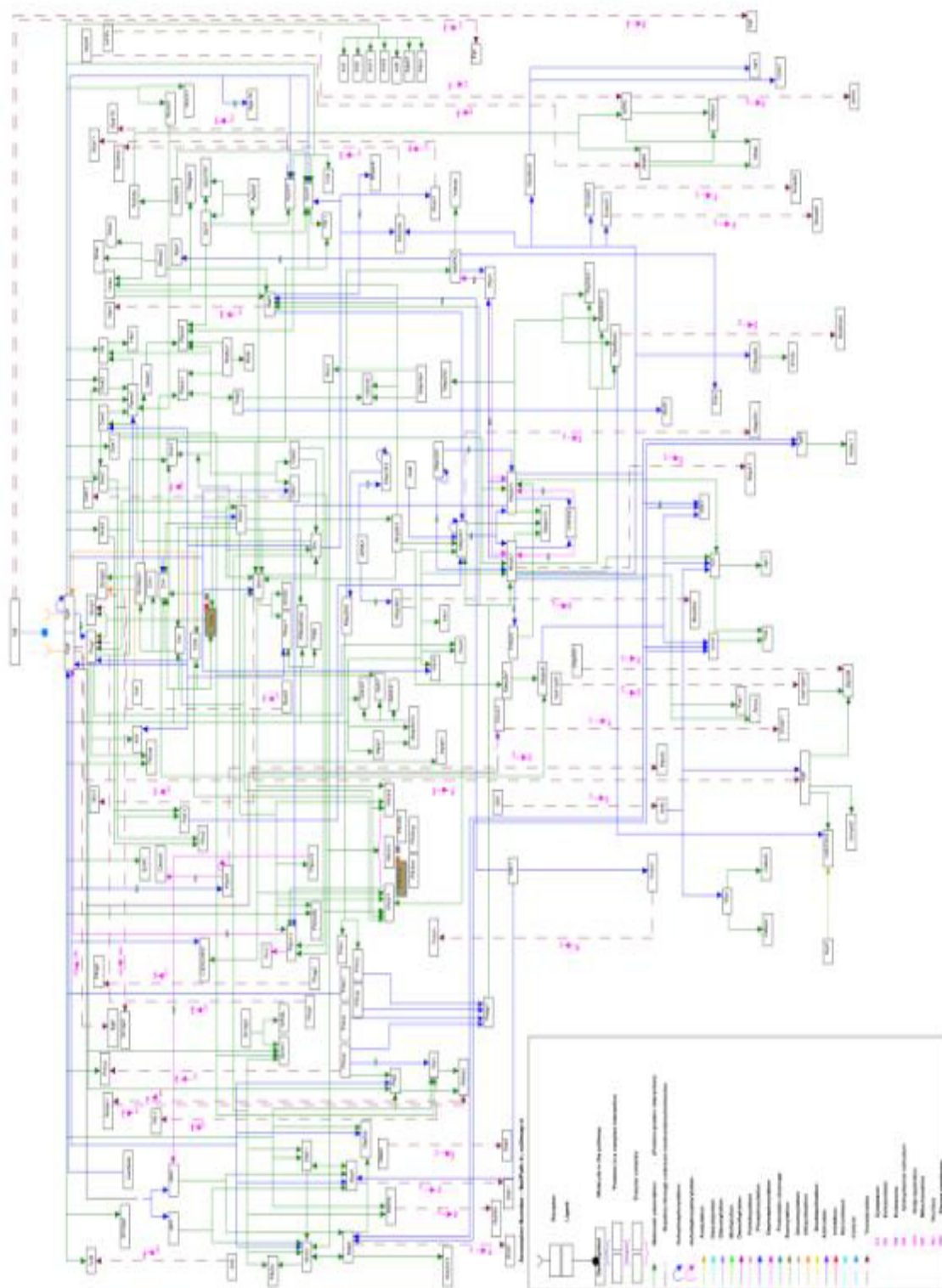


Figura 28.- Vía de señalización PIK3CA y CBL-C.

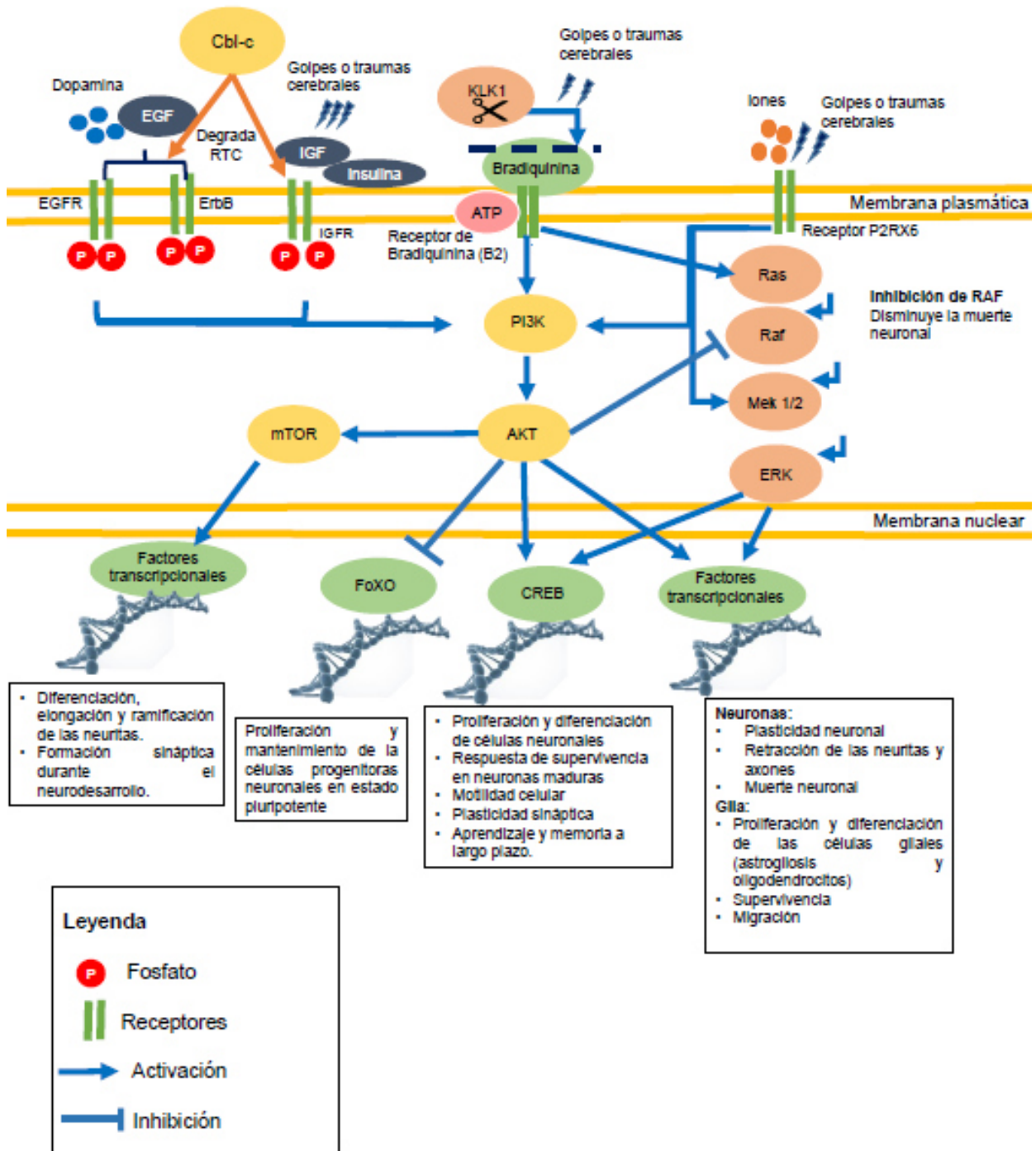


Figura 29.- Vía de señalización *KLK1*, *P2RX6* y *PIK3CA*. Se representan los productos de los genes *KLK1*, *P2RX6* y *PIK3CA*, los cuales tienen como blanco a AKT y la vía de Ras, siendo algunos de sus estímulos de activación, traumas o golpes en el cerebro, dando lugar a la activación de efectores (FoXo, CREB, entre otros factores transcripcionales aún no identificados), los cuales activarán diferentes señales, que repercutirán sobre las neuronas o sobre los diferentes tipos de células gliales. Mientras *CBL*, se encarga de degradar los receptores tirosina cinasa (RTC).

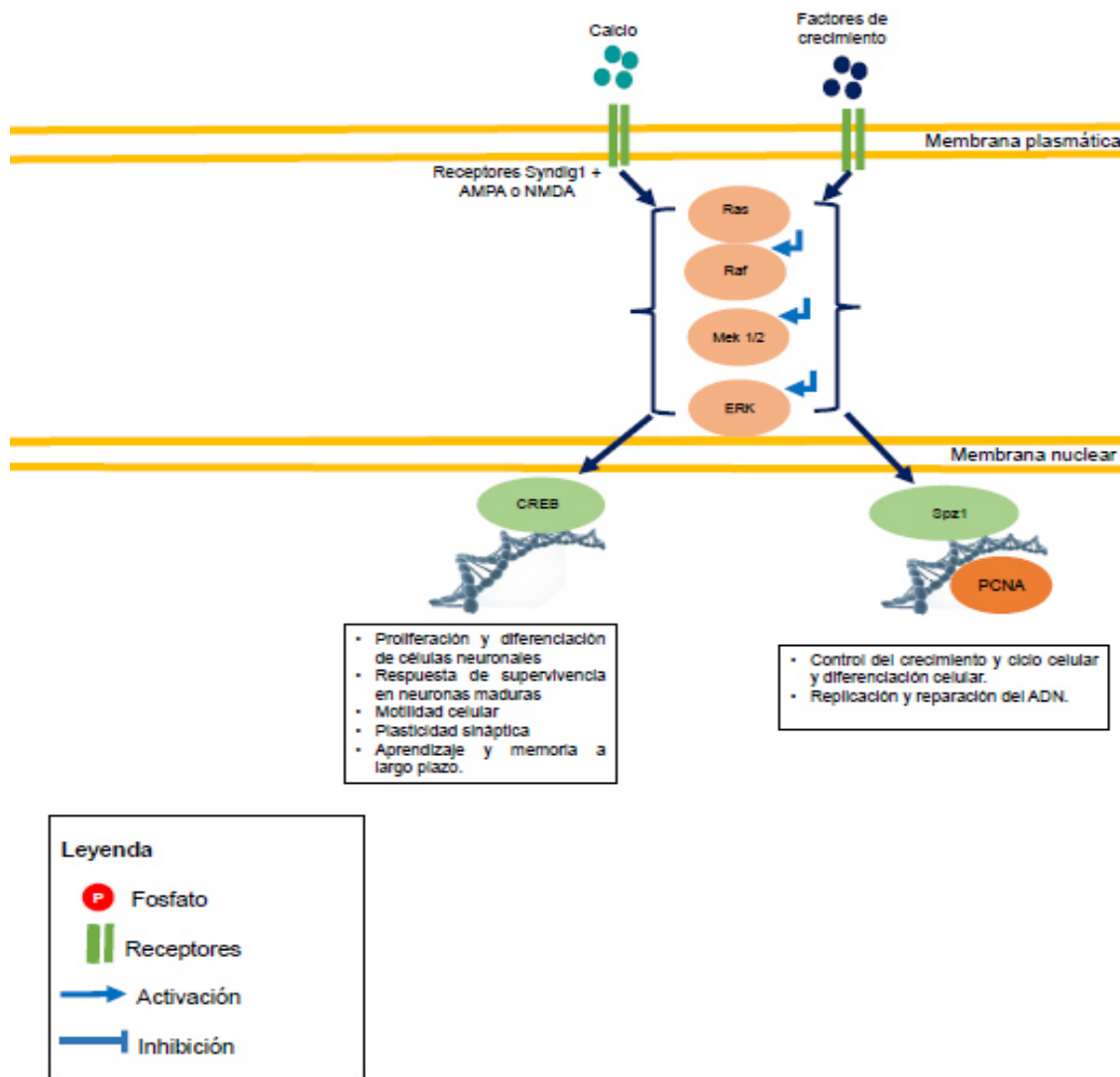


Figura 30.- Vía de señalización de *SYNDIG1* y *SPZ1*. En esta imagen se representan los productos de los genes *SYNDIG1* y *SPZ1* y sus efectos sobre la población celular de cerebro.